



CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
INIBIDORA DA TIROSINASE DE SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS
DA *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze E ENCAPSULAÇÃO
EM NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS.**

ANDREA SECCON

FLORIANÓPOLIS
2010

ANDREA SECCON

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E INIBIDORA DA TIROSINASE DE SUBSTÂNCIAS
EXTRAÍDAS DA *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze E
ENCAPSULAÇÃO EM NANOPARTÍCULAS
BIODEGRADÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Fármaco-medicamentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

S444c Seccon, Andrea

Caracterização da atividade antioxidante e inibidora da
tirosinase de substâncias extraídas da *Araucaria*
angustifolia (Bertol.) Kuntze e encapsulação em
nanopartículas biodegradáveis [dissertação] / Andrea Seccon
; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa. -
Florianópolis, SC, 2010.

122 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Pinheiro-do-paraná. 3. Araucariaceae.
4. Antioxidantes. 5. Lipoperoxidação. 6. Tirosinase. 7.
Nanopartículas. I. Pasa, Tania Beatriz Creczynski. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Andrea Seccon

Caracterização da atividade antioxidante e inibidora da tirosinase de substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze e encapsulação em partículas biodegradáveis.

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

Mestre em Farmácia

E aprovada na sua versão final em 30 de março de 2010, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração de Fármaco-medicamentos.

Elenara Lemos Sena
Coordenadora do Programa

BANCA EXAMINADORA:

Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Doutora em Química Biológica
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Presidente

Ângela Machado de Campos
Doutora em Farmácia
Universidade de Santiago de Compostela,
Espanha
Membro Titular

Cid Aimbiré de Moraes Santos
Doutor em Química Orgânica
University of Manchester, Reino Unido
Membro Titular

Edson Luis da Silva
Doutor em Farmácia e Análises Clínicas
Universidade de São Paulo
Membro Titular

Inês Rosane Z. De Oliveira
Doutora em Química
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Suplente

Aos dois amores da minha vida:
Luciano e Paula.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à minha filha Paula e meu marido Luciano que “seguraram as pontas” durante os inúmeros finais de semana que estive ausente de casa.

Agradeço também a todos os meus familiares (Seccons e Oliveiras) que de várias formas contribuíram para que eu pudesse assumir esse mestrado com mais tranquilidade.

Quero deixar um agradecimento especial à “profe Rô” que cuidou com muito carinho e responsabilidade da minha filhota durante o primeiro ano de vida dela (meu primeiro ano de mestrado), no qual apresentou uma séria alergia alimentar e precisou de cuidados especiais.

Um profundo agradecimento à professora Tânia, minha orientadora, que me aceitou em seu laboratório mesmo sabendo que eu estava afastada da academia havia 17 anos.

Ao professor Marcos Segatto, então coordenador do PGFAR, que me indicou os caminhos para o mestrado e à professora Ana Lucia que me abriu as portas e posteriormente me colocou em contato com a professora Tânia.

Às colegas Vânia Lima e Melina que me ensinaram a conduzir os experimentos que foram a base do meu trabalho.

Um super agradecimento ao colega Julian, da Colômbia, por quem tenho uma grande admiração; pela amizade, paciência, integridade e, sobretudo pela maneira como conduz seu trabalho acadêmico.

A todos os colegas de laboratório que de uma forma ou de outra colaboraram para execução deste trabalho. Especialmente às químicas Maurícia e Inês, que, além da amizade, oportunizaram a realização dos ensaios de voltametria cíclica apresentados neste trabalho. E aí não posso deixar de agradecer também ao professor André Pasa por abrir as portas do seu laboratório.

À professora Maique por ter fornecido as substâncias da araucária que foram os objetos de estudo desta dissertação de mestrado.

À Betina, pela colaboração, amizade, maturidade, oportunidade de trabalho e de crescimento profissional.

Aos professores da banca examinadora, pela avaliação desta dissertação.

Muito obrigada!

“Embora ninguém possa voltar
atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e
fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

SECCON, Andrea. **Caracterização da atividade antioxidante e inibidora da tirosinase de substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze e encapsulação em nanopartículas biodegradáveis**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Área: Fármaco-medicamentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2010.

Este estudo teve como objetivo caracterizar a atividade antioxidante e inibidora da tirosinase de substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* (SEAA) e encapsular a substância mais ativa em nanopartículas. As SEAA, denominadas neste estudo pelas siglas EHB (extrato hidroalcoólico bruto), FA (fração acetato), AB (ácido benzóico), PHA (ácido *para*-hidroxibenzóico), AP (ácido protocatéquico), EAB (epiafzelechina esterificada pelo ácido *para*-hidroxibenzóico) e EAP (epiafzelechina esterificada pelo ácido protocatéquico) foram primeiramente avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante pelos métodos de DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) e voltametria cíclica. Posteriormente as mesmas substâncias foram testadas quanto à capacidade de proteção contra a lipoperoxidação induzida pela radiação ultravioleta (UV) e pelos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ascorbila ($\cdot\text{Asc}$) tendo como alvo lipossomas de fosfatidilcolina de soja. A atividade inibidora da tirosinase foi primeiramente avaliada frente à enzima isolada e posteriormente foram conduzidos testes em linhagem celular de melanoma murino B16F10. Os resultados obtidos foram calculados pela média \pm desvio padrão em programa estatístico Graphpad Prisma 4. Todas as substâncias apresentaram atividade antioxidante de maneira dependente de concentração, porém EAP foi mais efetivo tanto nos ensaios de DPPH ($\text{IC}_{50} = 0,7 \pm 0,05 \mu\text{M}$) como em termos de potencial de oxidação (283 mV). Nos ensaios de lipoperoxidação EAP apresentou $\text{IC}_{50} = 21 \pm 2 \mu\text{M}$ e $35 \pm 5 \mu\text{M}$ para radiação UV e $\cdot\text{Asc}$, respectivamente e FA obteve $\text{IC}_{50} = 25 \pm 2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$; $17 \pm 1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $22 \pm 2 \mu\text{g.ml}^{-1}$, para UV, $\cdot\text{Asc}$ e $\cdot\text{OH}$, respectivamente. Nos ensaios de inibição da tirosinase isolada foram obtidos $\text{K}_{0,5} = 8 \pm 3 \mu\text{M}$; $9 \pm 1 \mu\text{M}$ e $32 \pm 2,5 \mu\text{M}$ para EAB, AB e PHA respectivamente e um $\text{K}_{0,5} = 21 \pm 2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $30 \pm 4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para FA e

EHB. A inibição da tirosinase celular foi avaliada para EAB ($IC_{50} = 1 \mu M$) frente à hidroquinona usada como controle positivo ($IC_{50} = 0,7 \mu M$). Os resultados obtidos foram promissores e FA foi selecionada para ser encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas para a preparação de uma formulação para uso cosmético. Algumas formulações foram testadas e a escolhida obteve um percentual de encapsulação de 83%, calculado a partir de uma curva de calibração obtida dos espectros de absorção desta fração em espectrofotômetro UV/VIS.

Palavras chave: *Araucaria angustifolia* Família Araucariaceae, antioxidante, lipoperoxidação, tirosinase, células B16F10, nanopartículas lipídicas.

ABSTRACT

Characterization of antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of the substances extracted from the *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze and encapsulation in biodegradable nanoparticles.

The aim of this study was to characterize the antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of the substances extracted from the dead-bark of *Araucaria angustifolia* (SEAA) and encapsulate the most active substance in nanoparticles. The SEAA, named as EHB (crude extract), FA (acetate fraction), AB (benzoic acid), PHA (para-hydroxybenzoic acids), AP (protocatechuic acid), EAB (epiafzelechina esterified by *para*-hydroxybenzoic acids) and (EAP epiafzelechina esterified by protocatechuic acid) were first assessed for their antioxidant potential by the method of DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) and the cyclic voltammetry (VC) was carried out to obtain the redox potentials of the isolated compounds. Subsequently the same substances were tested for their ability to protect the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiation (UV), and hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) and ascorbyl ($\cdot\text{Asc}$) radicals targeting soy phosphatidylcholine liposomes. The tyrosinase inhibitory activity was first evaluated toward the isolated enzyme and further tests were performed on cell lines of murine melanoma B16F10. The results were showed as mean \pm standard deviation obtained with the Graphpad Prism4 statistical software. All substances presented antioxidant activity in a concentration-dependent manner, and EAP showed the best antioxidant potential. For DPPH assay the $\text{IC}_{50} = 0.7 \pm 0.05 \mu\text{M}$ and the oxidation potential of 283 mV. Evaluating the protection toward the lipid peroxidation EAP presented $\text{IC}_{50} = 21 \pm 2 \mu\text{M}$ and $35 \pm 5 \mu\text{M}$ for UV and $\cdot\text{Asc}$, respectively and FA presented $\text{IC}_{50} = 25 \pm 2.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $17 \pm 1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and $22 \pm 2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for UV, $\cdot\text{Asc}$ and $\cdot\text{OH}$, respectively. The $\text{K}_{0.5}$ obtained following the effect of the plant material on tyrosinase activity were $8 \pm 3 \mu\text{M}$; $9 \pm 1 \mu\text{M}$ and $32 \pm 2.5 \mu\text{M}$ for EAB, AB and PHA, respectively, and $21 \pm 2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and $30 \pm 4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ to FA and EHB, respectively. The inhibition of the cell tyrosinase was evaluated for EAB ($\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$) and is comparable to the one obtained with hydroquinone, used as positive control ($\text{IC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$). FA was then selected to be encapsulated in lipid nanoparticles for the preparation of a formulation for cosmetic use. Some formulations have been evaluated and the chosen one allowed an encapsulation percentage of 83 %, calculated from a calibration curve obtained from

the absorption spectrum of this fraction in a spectrophotometer UV / VIS.

Keywords: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, Family Araucariaceae, antioxidant, lipid peroxidation, tyrosinase, B16F10 cells, lipid nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estresse oxidativo no processo de envelhecimento. Adaptado de Finkel e Holbrook (2000).	36
Figura 2: Reação de lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados. ...	38
Figura 3: Complexação entre radical ascorbil e ferro microsossomal catalisando um processo oxidativo em membranas biológicas. Adaptada de Casalino et al. (1996).	40
Figura 4: Corte transversal de um lipossoma unilamelar.....	41
Figura 5: Estrutura nuclear dos flavonóides.	42
Figura 6: Desenho esquemático da estrutura da pele; em destaque o melanócito na camada basal da epiderme com seus dendritos entre os queratinócitos.	44
Figura 7: Primeira fase da eumelanogênese e feomelanogênese. As setas largas representam as reações mediadas pela tirosinase. Adaptado de Ozeki et al. (1997).	46
Figura 8: Triagem, pelo método do DPPH, das SEAA. As amostras estão na concentração de 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para EHB e FA e 50 μM para as SI.....	61
Figura 9: Representação gráfica da obtenção das IC_{50} de EAP para o método de DPPH pelo plot de Hill. Todas as demais IC_{50} dos ensaios de DPPH e lipoperoxidação foram calculados da mesma forma.	62
Figura 10: Corrente de pico anódico (oxidação) das substâncias extraídas da AA em mV. Quercetina como padrão a 30 μM	64
Figura 11: Voltamogramas cíclicos das SEAA e da quercetina (padrão). Condições do ensaio: amostras a 30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ou 30 μM , solução carreadora: tampão fosfato (0,1 M pH 6,0), velocidade de varredura: 100 $\text{mV}.\text{s}^{-1}$ a) EHB; b) FA; c) AB; d) PHA; e) EAB; f) EAP; g) AP; h) Quercetina.....	66
Figura 12: Gráfico que representa o comportamento de EHB e FA na concentração de 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ numa cinética de avaliação da atividade da tirosinase isolada monitorada por 30 min.....	70

Figura 13: Gráfico que representa o comportamento das SI a 50 μM numa cinética de avaliação da atividade da tirosinase monitorada por 30 minutos. A hidroquinona foi usada como padrão de inibição também na concentração de 50 μM71

Figura 14: Viabilidade celular após incubação de 48h com as SEAA. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada barra representa a Média \pm desvio padrão (n=3). Os valores de $*p<0,05$, $**<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t (Bonferroni). a) EHB; b) FA; c) AB; d) PHA; e) AP; f) EAP.72

Figura 15: Avaliação da Inibição da tirosinase por EAB em células B16F10. Os valores de $*p<0,05$, $**<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni. Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.74

Figura 16: Avaliação da Inibição da tirosinase pela Hidroquinona (controle positivo) em células B16F10. Os valores de $*p<0,05$, $**<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni. Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.74

Figura 17: Avaliação da inibição da tirosinase por EAB e Hidroquinona (controle positivo). A diferença entre amostra e controle não foi significativa $p>0,05$. Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.75

Figura 18: Espectros de absorção de FA nas concentrações entre 0 e 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$76

Figura 19: (a) curva de calibração da FA em 224 nm (maior absorção) e (b) 280 nm (absorção das catequinas) feitas a partir dos espectros desta fração em espectrofotômetro UV-VIS.76

Figura 20: Relatório do equipamento Zetasizer nano ZS que demonstra o resultado da medida de potencial zeta de F2.77

Figura 21: Relatório do equipamento zetasizer nano ZS que demonstra a estabilidade de F.4 através do resultado da medida de potencial zeta.79

Figura 22: Imagem de microscopia ótica da formulação F2. A escala representa 10 μ M. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reações químicas da lipoperoxidação (Kehrer, 1993).....	38
Tabela 2: Atividade antioxidante das SEAA por DPPH e VC.....	63
Tabela 3: Lipoperoxidação induzida por UV, ascorbila e hidroxila.....	68
Tabela 4: Inibição da tirosinase isolada.....	71
Tabela 5: Caracterização físico-química das partículas.....	78
Tabela 6: Teor de ativo e eficiência de encapsulação	80

LISTA DE ABREVIATURAS

•Asc	radical ascorbila
AB	ácido benzóico
AP	ácido protocatéquico
DPPH	1,1-diphenil-2-picrilhidrazil
EAB	epiafzelechina esterificada pelo ácido <i>para</i> -hidroxibenzóico
EAP	epiafzelechina esterificada pelo ácido protocatéquico
EHB	extrato hidroalcoólico bruto
ERNS	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
FA	fração acetato
HO ₂ •	radical hidroperoxila
Log <i>P</i>	logaritmo do coeficiente de partição
LUVs	vesículas grandes unilamelares
MLVs	vesículas grandes multilamelares
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NO•	óxido nítrico
O ₂ ••	radical ânion superóxido
•OH	radical hidroxila
ONOO•	peroxinitrito
PHA	ácido <i>para</i> -hidroxibenzóico
RO•	radical alcóxila
RO ₂ •	radical peroxila
SEAA	substâncias extraídas da <i>Araucaria angustifolia</i>
SI	substâncias isoladas
SOD	superóxido dismutase

SUVs vesículas pequenas unilamelares

TBARS espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE EQUAÇÕES

Esquema 1	39
Esquema 2	39
Esquema 3	39
Esquema 4	57
Esquema 5	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1	ENVELHECIMENTO CUTÂNEO	33
2.2	RADIAÇÃO UV E GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS	33
2.3	RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS	34
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO	35
2.5	LIPOPEROXIDAÇÃO	37
2.6	QUÍMICA DOS RADICAIS HIDROXILA E ASCORBILA	39
2.7	LIPOSSOMAS COMO MODELO DE MEMBRANA	40
2.8	FLAVONOIDES.....	41
2.9	MELANOGÊNESE	43
2.10	<i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> (BERTOL.) KUNTZE.....	45
2.11	ENCAPSULAÇÃO EM NANOPARTÍCULAS.....	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	MATERIAIS	51
4.2	MÉTODOS	52
4.2.1	Isolamento e identificação dos compostos fenólicos.....	52
4.2.2	Monitoramento radical DPPH	53
4.2.3	Voltametria cíclica	53
4.2.4	Síntese do radical ascorbila	53
4.2.5	Síntese de radical hidroxila	54
4.2.6	Obtenção de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico	54

4.2.7	Medida da lipoperoxidação pelo método das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)	54
4.2.8	Lipoperoxidação induzida pela radiação UV	54
4.2.9	Lipoperoxidação induzida por radicais livres	55
4.2.10	Preparação de microsomas de fígado de rato	55
4.2.11	Determinação da concentração de proteína.....	56
4.2.12	Lipoperoxidação em microsomas de fígado de rato induzida pelo radical ascorbila	56
4.2.13	Lipoperoxidação em microsomas induzida pela radiação UV	57
4.2.14	Ensaio colorimétrico de inibição da tirosinase	57
4.2.15	Inibição da tirosinase em cultura de células B16F10	58
4.2.16	Medida do conteúdo de melanina	58
4.2.17	Ensaio de viabilidade celular	58
4.2.18	Preparação das nanopartículas lipídicas.....	59
4.2.19	Preparação das nanopartículas poliméricas.....	59
4.2.20	Caracterização das nanopartículas	59
4.2.20.1	Determinação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta.....	59
4.2.20.2	Eficiência de encapsulação	60
4.2.21	Análise estatística.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	61
5.1.1	Reatividade com DPPH	61
5.1.2	Ensaio de lipoperoxidação em lipossomas	65
5.1.2.1	Proteção contra a lipoperoxidação induzida pela radiação UV	67
5.1.2.2	Proteção contra a lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila	69
5.1.2.3	Proteção contra a lipoperoxidação induzida pelo radical hidroxila	69
5.2	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA TIROSINASE	69
5.2.1	Ensaio colorimétrico de inibição da tirosinase.....	70
5.2.2	Viabilidade celular (B16F10).....	72
5.2.3	Ensaio de inibição da tirosinase em células B16F10	73
5.3	ESTUDO PRELIMINAR DE ENCAPSULAÇÃO EM NANOPARTÍCULAS	75
6	CONCLUSÕES	81

7	PERSPECTIVAS.....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO	97

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento do ser humano tem sido tema de pesquisa em todo o mundo. Muitos dos enigmas deste processo vêm sendo desvendados, porém ainda há muito por descobrir. A pele é o maior órgão do corpo humano e por ser externo, é consequentemente o que mais explicita sinais deste processo. Rugas, manchas senis, ressecamento, flacidez, fragilidade da pele entre outros são alguns dos sinais aparentes do envelhecimento cutâneo (JENKINS G., 2002; KLIGMAN L. e KLIGMAN A., 1996; XU e FISHER, 2005). Estes problemas dermatológicos têm sido cada vez mais amenizados pelo uso de produtos cosméticos formulados com princípios ativos seguros e eficazes que aliam atividade cientificamente comprovada às mais recentes tecnologias de manufatura.

A radiação ultravioleta (UV) é um dos fatores ambientais que estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), reforçando a teoria proposta por Harman de que as EROS seriam responsáveis pelo envelhecimento. Esta radiação, ao incidir na pele sob a forma de energia eletromagnética precisa ser absorvida e convertida em energia química e este processo gera espécies reativas (BERTLING et al., 1996; XU e FISHER, 2005). Quando a concentração de EROS encontra-se em excesso em relação às defesas antioxidantes endógenas podendo acarretar possíveis danos, ocorre o que Sies denominou de estresse oxidativo (SIES, 1991, HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KEHRER, 2000).

As EROS são formadas através da redução deste elemento à água, envolvendo reações sucessivas univalentes que irão gerar o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A dismutação deste radical origina o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que por sua vez formará o radical hidroxila ($\cdot OH$). Um radical livre pode ser definido como um átomo ou uma molécula independente que possui um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984), isto altera a reatividade química do átomo tornando-o mais reativo do que a sua forma não radical (AHSAN et al., 2003). Os radicais livres caracterizam-se por apresentarem instabilidade, reatividade e paramagnetismo elevados (KEHRER J.P., 1993).

O dano celular provocado por EROS caracteriza-se inicialmente pelo ataque às membranas biológicas provocando um processo de oxidação em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados que compõem a bicamada lipídica denominado de lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Uma vez iniciada a reação de lipoperoxidação

ocorre uma perturbação no processo de transporte celular entre as membranas gerando efeitos secundários como ligações cruzadas de proteínas fibrosas (colágeno e beta amilóide), envelhecimento, formação de placas senis de Morbus Alzheimer, entre outras (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonoides são compostos fenólicos que se encontram distribuídos nas folhas, cascas, sementes e flores onde exercem um papel protetor contra a radiação UV, patógenos e herbívoros (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HEIM K.E. et al., 2002). Esta classe de compostos geralmente absorve na mesma faixa do UVB (280-315 nm) podendo assim agir como filtros UV, protegendo assim os tecidos fotossintéticos subjacentes do fotodano (HARBONE e WILLIAMS, 2000). Há relatos da atividade dos flavonoides como anticâncer, anti-inflamatório, antibacteriano e protetor contra a radiação UV. Alguns destes efeitos são baseados na modulação do sistema imune, mas outros estão relacionados à capacidade antioxidante e sequestradora de EROS e quelante de metais em sítios ativos de metaloenzimas. Eles podem também apresentar efeito hipopigmentante por inibição direta da tirosinase e também por ação na via oxidativa da melanogênese (SOLANO et al., 2006).

Neste trabalho avaliou-se a atividade antioxidante e inibidora da tirosinase de compostos fenólicos extraídos da *Araucaria angustifolia*. Estes ensaios foram conduzidos inicialmente por uma avaliação da atividade antioxidante de todas as substâncias pelos métodos de DPPH e voltametria cíclica com o objetivo de realizar uma triagem das amostras. Na sequência foram realizados ensaios de lipoperoxidação induzida pela radiação UV e pelos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ascorbila ($\cdot\text{Asc}$) para os quais foram usados lipossomas de fosfatidilcolina de soja como modelo de membrana. Este ensaio tem o objetivo de verificar se os SEAA podem proteger a membrana dos danos causados pelos indutores da lipoperoxidação. Uma das substâncias, a que apresentou maior atividade antioxidante, foi testada também em microsomas de fígado de rato, um modelo de membrana que apresenta alguns interferentes tais como composição lipídica heterogênea, presença de proteínas, metais e antioxidantes intrínsecos (CASALINO et al., 1996). Após esta etapa as mesmas substâncias foram testadas quanto a sua capacidade de inibir a tirosinase, uma enzima que contém cobre e exerce um papel chave na síntese de melanina. Primeiramente foi realizada uma triagem das amostras através de ensaios de inibição da tirosinase de cogumelo e a partir destes resultados as amostras passaram a ser testadas em linhagem de células de melanoma murino B16F10. A fração acetato, (FA) que apresentou bons resultados tanto para atividade antioxidante quanto

inibidora da tirosinase, foi encapsulada em sistemas nanoparticulados para posterior aplicação em um produto cosmético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

Há muito tempo a ciência busca desvendar os mecanismos bioquímicos e moleculares que culminam no envelhecimento.

No processo de envelhecimento do organismo humano, a busca por retardar o envelhecimento cutâneo tem sido cada vez maior em função das alterações de ordem estética dele decorrentes. O envelhecimento da pele caracteriza-se por uma série de alterações biológicas que são agravadas pela exposição a fatores ambientais como a exposição ao sol. O envelhecimento cutâneo intrínseco é, em grande parte, determinado geneticamente e está associado a uma atrofia da pele, ressecamento, flacidez, rugas finas, aumento da fragilidade e perda de elasticidade (GILCHREST, 1984; JENKINS, 2002; HADSHIEW et al., 2000). Este processo ocorre pela combinação de alguns fatores como a diminuição da capacidade proliferativa das células da pele, diminuição da síntese de macromoléculas da matriz dérmica e aumento da expressão de enzimas que degradam a matriz de colágeno.

No entanto, a maioria dos problemas de pele associados a alterações cosméticas é advinda da exposição à radiação ultravioleta (UV), que provoca efeitos cumulativos ao longo do tempo. Uma pele foto-envelhecida caracteriza-se, de modo geral, pela presença de rugas profundas, desordens de pigmentação (JENKINS, 2002), perda do tônus e da resiliência (KLIGMAN L. e KLIGMAN A., 1996; XU e FISHER, 2005). Este fenótipo é causado por alterações na função celular, bem como uma deterioração da matriz extracelular da derme. A derme dá suporte estrutural para a pele, e a exposição crônica à radiação UV leva à fragmentação e desorganização da estrutura primária das proteínas colágeno e elastina (JENKINS, 2002).

2.2 RADIAÇÃO UV E GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

A incidência da radiação UV sobre a pele desencadeia uma série de reações que acabam por gerar espécies reativas de oxigênio, o que reforça a hipótese de que o envelhecimento seria causado pelos radicais livres.

Para exercer este efeito sobre as células, a energia eletromagnética, inerente à radiação UV, precisa ser absorvida por cromóforos celulares e a energia absorvida, ser convertida a energia química. Cromóforos celulares como DNA, porfirinas, ácido urocâmico, e aminoácidos

aromáticos são capazes de absorver a energia UV. Estes cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular, resultando na geração de EROS. As EROS podem ser classificadas em duas categorias: radicais livres (radicais ânion superóxido e hidroxila) e espécies não radicalares (oxigênio singlet e peróxido de hidrogênio). Concentrações normais de EROS são controladas normalmente por antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos. Quando as concentrações de EROS encontram-se em excesso em relação à capacidade das defesas antioxidantes endógenas (estresse oxidativo), apresentam toxicidade ao organismo e, portanto, estão associadas a doenças e ao envelhecimento. O estresse oxidativo severo pode resultar em morte celular (BERTLING et al., 1996; XU, FISHER, 2005).

Outro radical livre que se encontra com concentrações aumentadas após a exposição à radiação UV é o radical ascorbila. Jurkiewicz e Buettner (1994) demonstraram por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) que o radical ascorbila, naturalmente presente em baixas concentrações em pele de rato sem pelo (SKH-1) não expostas à radiação UV, após a exposição à luz UV, apresentaram um aumento de intensidade para o sinal deste radical.

Tanto a radiação UVB (290 – 320 nm) quanto UVA (320 – 400 nm) induzem a geração de EROS nas proximidades ou diretamente na superfície das membranas celulares na pele humana (JURKIEWICZ e BUETTNER, 1994; XU e FISHER, 2005).

2.3 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS

Um radical livre pode ser definido como um átomo ou uma molécula independente que possui um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). Este elétron desemparelhado altera a reatividade química do seu respectivo átomo no sentido de torná-lo mais reativo do que a sua forma não radical (AHSAN et al., 2003). Os radicais livres caracterizam-se por serem altamente instáveis, reativos e paramagnéticos (KEHRER, 1993).

Espécie reativa é um termo empregado tanto para radicais livres quanto para moléculas não radicalares capazes de promover reações de oxidação ou de redução em condições fisiológicas (KEHRER, 1993). As espécies reativas podem ser classificadas de acordo com a molécula de origem em espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

As EROS são formadas através da redução deste elemento à água, envolvendo reações sucessivas univalentes que irão gerar o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A dismutação deste radical origina o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que por sua vez formará o radical hidroxila ($\cdot OH$). As ERNS, entre as quais as mais conhecidas são o óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio ($\cdot NO$) e o peroxinitrito formado da reação do $\cdot NO$ com o $O_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além do peroxinitrito, substâncias derivadas do $\cdot NO$ como o nitrito podem reagir com o ácido hipocloroso ($HClO$), formado no processo inflamatório através da reação da enzima mieloperoxidase com o peróxido de hidrogênio, formando NO_2Cl e $\cdot NO_2$. Estes produtos podem causar diversas conseqüências para o organismo, como a nitrosilação do aminoácido tirosina, além de reações de oxidação em geral (FOLKERTS et al., 2001). Os danos que serão causados pelas espécies reativas são dependentes da quantidade ou natureza dos mesmos, bem como da região onde são formados e das defesas antioxidantes celulares (DAVIES, 1991; FRAGA et al., 1987). As EROS podem ser formadas a partir de inúmeras fontes *in vivo*. Estas incluem auto-oxidação, reações fotoquímicas e enzimáticas, e podem envolver compostos endógenos e diversos xenobióticos. É grande o número de enzimas que se mostram capazes de gerar EROS; dentre estas estão os citocromos P450, várias oxidases, peroxidases, lipoxigenases e desidrogenases (KEHRER, 2000).

A geração de EROS e de ERNS foi observada em vários processos fisiológicos, resultando na oxidação de vários alvos biológicos, incluindo proteínas, enzimas, lipídeos e DNA (BOKOV et al., 2004).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes endógenas, resultando em eventuais danos ao organismo (SIES, 1991; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KEHRER, 2000). É também considerado um dos fenômenos espontâneos mais importantes no processo de envelhecimento por afetar moléculas biológicas (KAUR et al., 2007).

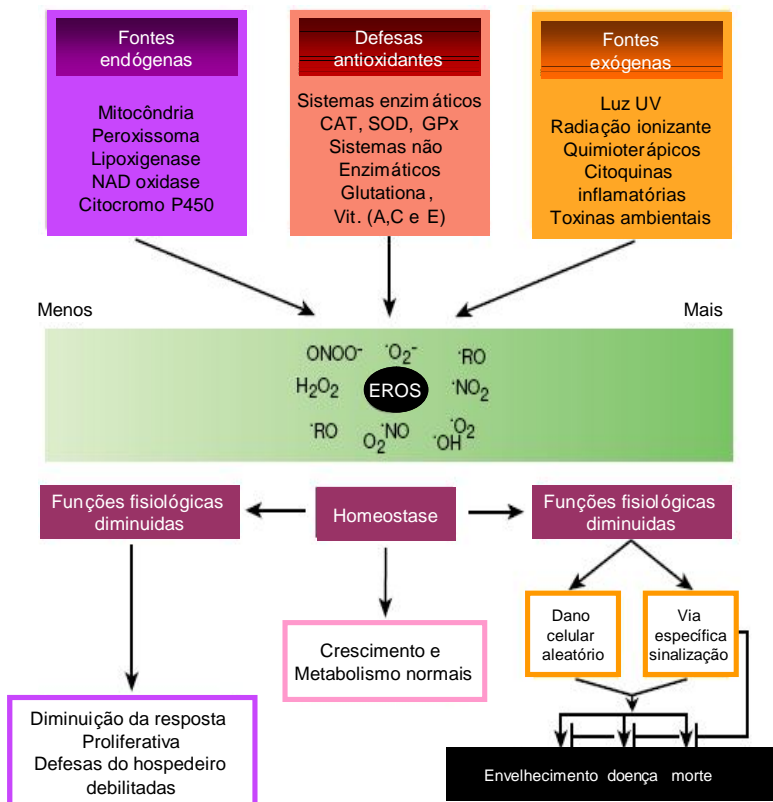


Figura 1: Estresse oxidativo no processo de envelhecimento. Adaptado de Finkel e Holbrook (2000).

Este processo ocorre principalmente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial onde é metabolizada a maior parte do oxigênio da célula. Os produtos deste processo de respiração celular tais como: radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são as fontes potenciais de dano oxidativo (Figura 1) tanto para a própria mitocôndria quanto para outros compartimentos celulares.

O sistema sequestrador de EROS é bastante complexo e inclui diferentes substâncias redutoras de estruturas lipoprotéicas (tocoferóis, licopeno, carotenóides, ubiquinol) e do citosol (ácido ascórbico, glutathione reduzida) e um sistema antioxidante enzimático do qual fazem parte enzimas citosólicas tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (BOKOV et al., 2004).

2.5 LIPOPEROXIDAÇÃO

A lipoperoxidação é considerada a reação chave no dano celular levando a consequências como perturbação no processo de transporte celular através das membranas e efeitos secundários como ligações cruzadas de proteínas fibrosas (colágeno e beta amilóide), envelhecimento, formação de placas senis de Morbus Alzheimer, entre outras (HAVSTEEN, 2002).

Segundo Halliwell e Gutteridge (2000), a lipoperoxidação foi definida por A. L. Tappel como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”. Os ácidos graxos poliinsaturados são mais facilmente oxidados por espécies reativas do que os monoinsaturados ou saturados, por possuírem ligações duplas conjugadas, em que o hidrogênio bisalílico presente possui uma menor energia de dissociação que facilita o processo de abstração (KOPPENOL, 1990; WAGNER et al., 1994).

Os lipídeos têm um papel estrutural e funcional crítico nas membranas, e qualquer transtorno deste papel pode causar a morte celular. As duplas ligações encontradas nos ácidos graxos poliinsaturados são alvos propensos ao ataque de espécies reativas. Como representado na tabela 1 e na figura 2, a reação de lipoperoxidação inicia com a abstração de um átomo de hidrogênio de uma destas ligações duplas e produz um novo radical livre que pode interagir facilmente com o oxigênio molecular. O radical peroxil lipídico resultante pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo, produzindo ainda outro radical livre e um hidroperóxido lipídico, estabelecendo assim uma reação em cadeia. O hidroperóxido lipídico formado é instável e pode decompor-se em diversas moléculas, incluindo malondialdeído, ou pode ser reduzido a forma álcool mais estável.

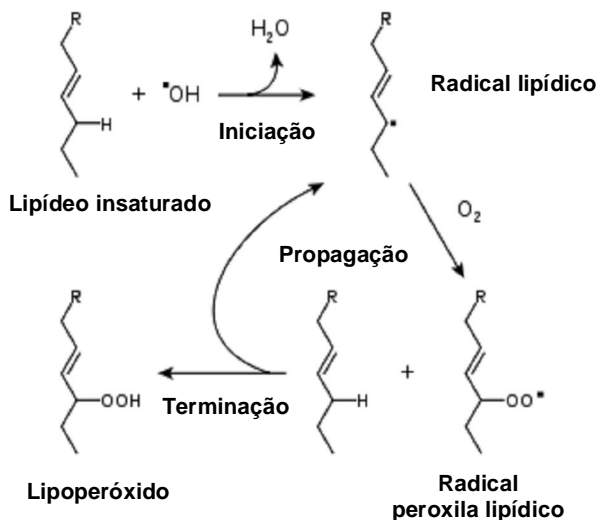


Figura 2: Reação de lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 1: Reações químicas da lipoperoxidação (Kehrer, 1993).

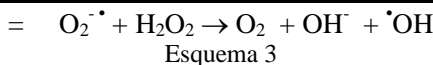
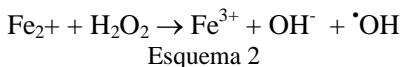
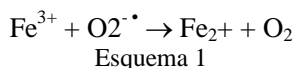
Iniciação	$\text{X} + \text{RCH} = \text{CHR} \rightarrow \text{RCH}(\text{X}) - \text{CHR}$ ou $\text{X}^\bullet + \text{RCH} = \text{CHR} \rightarrow \text{RCH}(\text{X}) - \cdot\text{CHR}$
Transferência de elétrons	$\text{X}^{\bullet-} + \text{Y} \rightarrow \text{X} + \text{Y}^\bullet$
Abstração de hidrogênio	$\text{X}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{XH} + \text{R}^\bullet$
Terminação	$\text{X}^\bullet + \text{X}^\bullet \rightarrow \text{X}_2$

(X) representa esquematicamente uma espécie reativa; (X^\bullet) representa esquematicamente um radical livre; os demais símbolos representam esquematicamente um substrato oxidável.

Com o progresso destas reações, canais iônicos podem ser afetados, proteínas transportadoras de membranas ou enzimas podem ser desativadas, ou a própria bicamada lipídica pode tornar-se mais permeável e assim perturbar a homeostase iônica. Além disso, algumas das espécies oxidadas de ácidos graxos que são formadas, como as isoprostanas ou os hidroperóxidos, têm atividade biológica, no sentido de afetar a via de sinalização incluindo aquelas que regulam a forma apoptótica de morte celular (KEHRER, 2000).

2.6 QUÍMICA DOS RADICAIS HIDROXILA E ASCORBILA

Dentre as EROS, o radical hidroxila possui um dos maiores potenciais oxidativos, e é gerado in vivo a partir da redução monovalente da molécula de O_2 . Em sistemas biológicos, o radical hidroxila também pode ser produzido a partir da reação de Fenton/Haber-Weiss embora este ainda seja um tema discutível (SUTTON et al., 1989; LLOYD et al., 1997). A reação de Fenton (esquema 2) é catalisada pelo Fe^{3+} (ou Cu^{2+}), uma vez que este é reduzido ao interagir com $O_2^{\cdot-}$, gerando o íon ferroso. O Fe^{2+} pode reagir com H_2O_2 , recuperando o ferro em seu estado de maior oxidação e produzindo ânion hidroxila e $\cdot OH$. A somatória das duas reações descritas nos esquemas 2 e 3 constitui a reação de Haber-Weiss (KEHRER, 2000).



O radical ascorbila ($\cdot Asc$) é uma espécie intermediária formada durante a oxidação do ácido ascórbico ($AscH_2$) e ácido dehidroascórbico (DHA) (HUBEL et al., 1997).

Em microsomas de fígado de rato, o radical ascorbila parece complexar-se com o ferro ligado a membrana (figura 3). Casalino e colaboradores (1996) sugeriram que este complexo catalisaria o processo oxidativo em cadeias apolares de membranas biológicas.

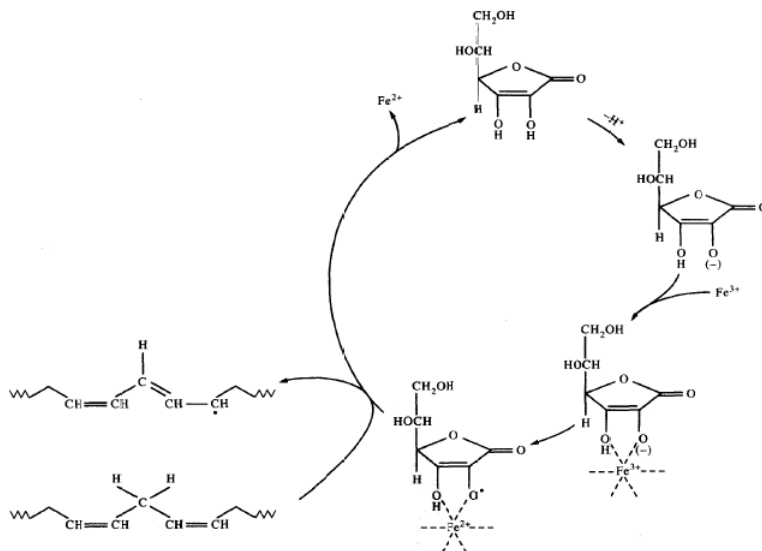


Figura 3: Complexação entre radical ascorbil e ferro microssomal catalisando um processo oxidativo em membranas biológicas. Adaptada de Casalino et al. (1996).

2.7 LIPOSSOMAS COMO MODELO DE MEMBRANA

Os lipossomas apresentam uma constituição lipídica que se assemelha a da matriz de células e organelas, e podem apresentar uma ou várias bicamadas, denominadas de lamelas, simulando determinadas características das membranas de forma eficiente (YEAGLE, 1993; CASTELLI et al., 1997).

Os lipossomas podem ser classificados, de um modo geral, de acordo com o seu tamanho em: a) vesículas grandes multilamelares (MLV), que possuem um diâmetro superior a 400 nm, compostas por muitas lamelas heterogêneas em seus compartimentos internos e são preparadas, geralmente, a partir da dispersão de lipídios em meio aquoso, seguido de agitação; b) vesículas grandes unilamelares (LUV), que apresentam diâmetros na faixa de 50-400 nm, são organizados em apenas uma bicamada e são preparadas a partir da filtração sob pressão em filtros de polycarbonato de porosidade definida, sonicação, ou extrusão de amostras de MLV; c) vesículas pequenas unilamelares (SUV), que possuem diâmetro na faixa de 20-50 nm e são mais instáveis em relação aos dois primeiros tipos de lipossomas (HOPE et al., 1986; WILSCHUT

e HOEKSTRA, 1986). A estrutura de um lipossoma unilamelar está representada na figura 4.

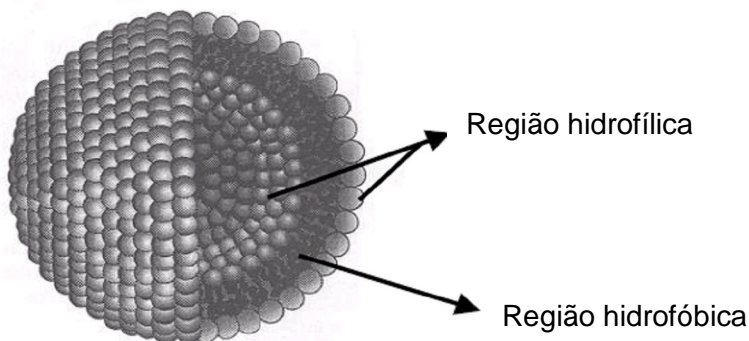


Figura 4: Corte transversal de um lipossoma unilamelar.

O uso de lipossomas como modelos de membrana é bastante difundido cientificamente, e proporciona vantagens como facilidade de produção, obtenção em grandes quantidades e maior facilidade de interpretação dos resultados face a complexibilidade das membranas celulares naturais (YEAGLE, 1993; CASTELLI et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2003). Além disso, é possível trabalhar com diferentes constituições lipídicas e estudar as alterações que estas diferenças constitucionais podem provocar nas membranas (DE LIMA et al., 2004).

Lipossomas de fosfatidilcolina têm sido amplamente utilizados como modelos de membranas para estudos de lipoperoxidação (DE LIMA et al., 2004). A fosfatidilcolina é um ácido graxo poliinsaturado, e, além disso, é o fosfolípídio presente em maior número na constituição de membranas celulares (YEAGLE, 1993). Neste trabalho foram utilizados lipossomos de fosfatidilcolina de soja como modelos de membranas lipídicas para os estudos de lipoperoxidação.

2.8 FLAVONOIDES

Os flavonoides (figura 5) constituem uma classe de compostos fenólicos secundários de baixo peso molecular encontrados nas plantas. Encontram-se distribuídos nas folhas, cascas, sementes e flores onde

exercem um papel protetor contra a radiação UV, patógenos e herbívoros (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HEIM et al., 2002). Os flavonóides da dieta humana são oriundos principalmente de frutas e vegetais de cores vermelha e azul (REINLI e BLOCK, 1996; HAMMERSTONE et al., 2000; HEIM et al., 2002).

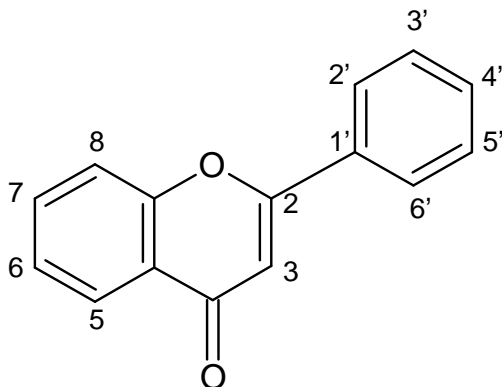


Figura 5: Estrutura nuclear dos flavonóides.

No espectro solar a radiação UVB encontra-se na faixa de 280-315 nm (menor comprimento de onda e maior energia). Esta radiação pode penetrar através da camada de ozônio atingindo a estratosfera e comprometer a vida das plantas. O conceito de resistência ao UVB em plantas explicaria a capacidade que elas possuem de se adaptar às quantidades crescentes desta radiação que podem atingir a terra no caso, por exemplo, de regiões onde há buracos na camada de ozônio. Esta resistência ao UV pode se dar de muitas formas, mas um tipo de resistência poderia ser atribuído aos pigmentos flavonoídicos presentes nas folhas verdes das plantas. Os flavonóides geralmente absorvem na mesma faixa do UVB (280-315 nm) e podem agir como filtros UV, protegendo então os tecidos fotossintéticos subjacentes do fotodano (HARBONE, 2000).

Estudos *in vitro* têm definido o potencial antioxidante dos flavonóides como um sequestrador direto de radicais livres (RICE-EVANS et al., 1996). Tal atividade antioxidante deve-se às propriedades químicas dos polifenóis de doarem hidrogênios fenólicos para estabilizar radicais livres. Para um polifenol ser definido como um antioxidante precisa satisfazer a duas condições básicas: 1) ser oxidado quando presente em

baixas concentrações em relação ao substrato retardando ou prevenindo assim a auto-oxidação ou uma oxidação mediada por radicais livres (HALLIWELL, 1990); 2) o radical formado precisa ser estável, por meio de ligações de hidrogênio intramoleculares, frente a outras oxidações (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Os flavonóides são empregados em inúmeros tratamentos médicos devido aos efeitos benéficos como anticâncer, anti-inflamatório, proteção contra UV entre outros. Alguns destes efeitos estão baseados na modulação do sistema imune, mas outros estão relacionados à capacidade antioxidante, seqüestradora de EROS e quelante de metais em sítios ativos de metaloenzimas. Eles podem também ter efeito hipopigmentante por inibição direta da tirosinase e também por agir na via oxidativa da melanogênese (SOLANO et al. 2006).

2.9 MELANOGÊNESE

A melanina exerce um papel importante na proteção da pele humana contra os efeitos nocivos do sol (radiação UV). É um pigmento sintetizado e transportado em organelas específicas chamadas melanosomas que se encontram situados no citoplasma dos melanócitos (figura 6). Os melanócitos estão presentes na pele e nos folículos pilosos, mas são igualmente encontrados em certos órgãos sensoriais como retina, ouvido interno e sistema nervoso central (leptomeninges). Na pele, essas células estão localizadas na camada basal da epiderme ou na parte inferior de folículos pilosos. Existem dois tipos de melanina: a eumelanina (marrom ou preta) e a feomelanina (vermelha ou amarela) que são responsáveis pela determinação do fototipo da pele humana (PASSERON et al., 2005). A cor da pele resulta de fatores como a densidade dos melanócitos, número, tamanho e dispersão dos melanosomas transportados para os queratinócitos na epiderme, natureza do pigmento e sua velocidade de degradação (SOLANO et al. 2006)

As eumelaninas e feomelaninas provém da transformação enzimática da L-tirosina em dihidroxifenilalanina (dopa) através da tirosinase, depois em dopaquinona também mediada pela tirosinase (PASSERON et al., 2005).

A dopaquinona é um intermediário extremamente reativo que sofre ciclização intramolecular na ausência de compostos tióis, levando à produção de eumelanina. Todavia, na presença de tióis, como cisteína, gera cisteinil DOPAs, e finalmente à feomelanina. (ITO et al., 2000).

A tirosinase, também conhecida como polifenol oxidase, é uma enzima que contém cobre e é largamente distribuída na natureza (NERYA et al., 2004). É a enzima limitante da melanogênese. Ela catalisa as duas primeiras reações da síntese das melaninas: a hidroxilação da tirosina em 3,4-dopa e a oxidação da dopa em dopaquinona (PASSERON et al., 2005) (Figura 7).

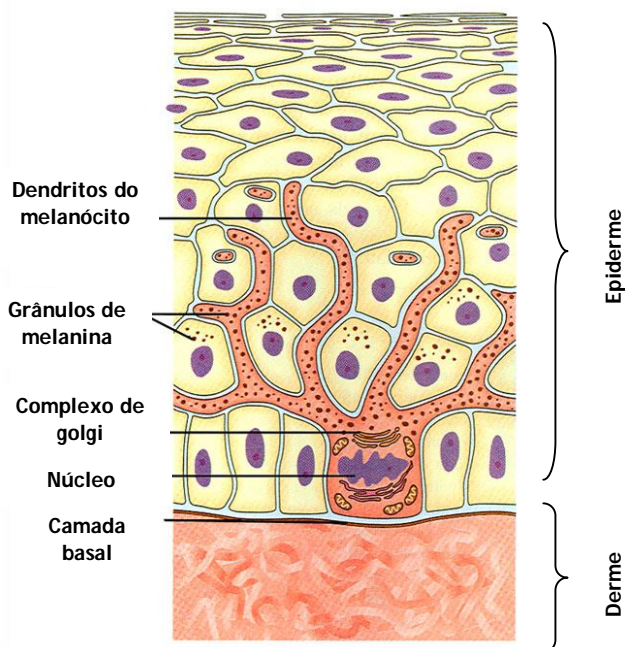


Figura 6: Desenho esquemático da estrutura da pele; em destaque o melanócito na camada basal da epiderme com seus dendritos entre os queratinócitos.

A radiação UV estimula a síntese de uma série de fatores epidérmicos como, por exemplo, o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) que age como um regulador parácrino estimulando a melanogênese, proliferação e sobrevivência dos melanócitos (HALABAN et al., 1988; IMOKAWA et al., 1992).

Uma série de doenças dermatológicas ocorre por distúrbios de pigmentação. Melasmas, manchas senis entre outros, são problemas que envolvem uma hiperpigmentação epidérmica. É crescente a busca por produtos que atuem de maneira segura e eficaz na prevenção da

hiperpigmentação por inibição da oxidação enzimática. Um grande número de inibidores da tirosinase tem sido descritos, a maioria deles consiste de estruturas fenólicas ou são quelantes de metais (NERYA et al., 2004).

2.10 *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze pertence à família Araucareaceae e é uma espécie nativa da mata atlântica tropical encontrada exclusivamente no hemisfério sul. No Brasil, a *Araucaria angustifolia*, também conhecida por pinheiro do Paraná, araucária ou pinheiro brasileiro, pode ser encontrada apenas nos três estados da região sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), tanto em populações nativas quanto cultivadas. O pinheiro brasileiro é também valorizado como planta ornamental e suas sementes ricas em amido constituem uma importante fonte de alimento (ZANDEVALLI et al., 2004).

A araucária consta na lista de espécies ameaçadas de extinção desde 1992, sinalizando a necessidade de adoção de medidas efetivas imediatas para garantir a proteção e a recuperação dos remanescentes da Floresta com Araucária (Floresta Ombrófila Mista), cujo perfil é caracterizado principalmente por um extrato arbóreo superior, que dá à floresta um desenho exclusivo. Segundo dados da Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, atualmente, os remanescentes desse rico e original ecossistema estão extremamente fragmentados, sendo menos de 3% da área original.

Estudos prévios verificaram o potencial antioxidante do extrato das folhas da planta (Yamaguchi et al., 2002 e 2005). Do extrato das folhas foram isolados biflavonóides (Yamaguchi et al., 2002 and 2009) e isoflavonas (Fonseca et al., 2000), da resina foram isolados lignanos e nor-lignanos (Ohashi et al., 1992; Fonseca et al., 1979) e diterpenos (Campello e Fonseca, 1975). O isolado amentoflavona - tipo biflavonoides (C8''-C3') demonstraram alta capacidade antioxidante e alta capacidade sequestradora de oxigênio singlet bem como de inibir a oxidação do DNA e a lipoperoxidação promovida por radicais livres (Yamaguchi et al., 2005). No entanto este é o primeiro estudo que está sendo realizado para investigar a atividade do extrato da casca morta da araucária que é naturalmente descartada pelas árvores e pode ser coletada sem danificá-las.

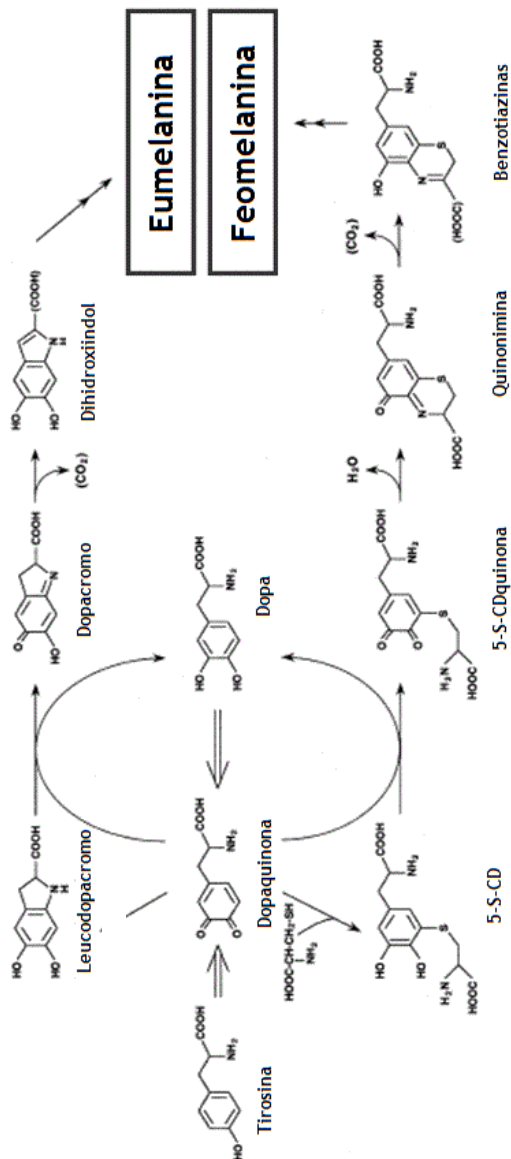


Figura 7: Primeira fase da eumelanogênese e feomelanogênese. As setas largas representam as reações mediadas pela tirosinase. Adaptado de Ozeki et al. (1997).

2.11 ENCAPSULAÇÃO EM NANOPARTÍCULAS

As substâncias extraídas da araucária, por apresentarem atividade antioxidante, podem ser de interesse para a aplicação em preparações cosméticas para a prevenção do envelhecimento cutâneo. Em ensaios prévios de estabilidade realizados em nosso laboratório, foi preparado um creme base contendo o extrato EHB e durante a estocagem verificou-se o surgimento de uma coloração marrom que provavelmente resultou do processo de oxidação e de reações de condensação envolvendo os numerosos grupos fenólicos presentes no extrato (ANDRY et al., 1998). Concluiu-se então, que o extrato em estudo necessitaria de algum sistema de proteção contra a oxidação e a encapsulação do ativo em sistemas nanoparticulados poderia ser uma alternativa.

A encapsulação de ativos implica numa série de técnicas que tem por objetivo proteger substâncias sólidas ou líquidas, quer seja por meio da formação de matrizes ou pelo revestimento das mesmas por um polímero, ou lipídeo. Este princípio tem sido utilizado em uma ampla variedade de aplicações industriais, apresentando diversas vantagens, entre elas a melhoria da estabilidade. (WATTS et al., 1990).

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais sólidos cujo tamanho oscila entre 10 e 1000 nm (nanômetros), que podem apresentar-se como sistemas matriciais homogêneos constituídos por uma rede polimérica (nanoesferas) ou como estruturas vesiculares homogêneas em que o ativo encontra-se confinado numa cavidade envolvida por uma parede polimérica (nanocápsulas). Estes sistemas podem ser elaborados a partir de uma ampla variedade de materiais biocompatíveis, através de diferentes métodos de preparação.

Nanopartículas lipídicas são partículas que possuem uma matriz lipídica e diâmetro em torno de uma centena de nanômetros, sendo estabilizadas por tensoativos. As principais características das nanopartículas lipídicas são, a excelente estabilidade física, proteção de ativos instáveis frente à degradação, controle de liberação, boa tolerabilidade, possibilidade de vetorização, além de não apresentarem problemas relacionados à produção em grande escala e à esterelização (WISSING, KAYSER, MULLER, 2004).

As nanopartículas lipídicas apresentam características de liberação adequadas à aplicação dérmica. O perfil de liberação de um princípio ativo encapsulado nestas nanopartículas é marcado por uma alta liberação inicial, permitindo uma boa penetração, seguida de uma liberação controlada que entre outras vantagens, diminui a irritabilidade

provocada por certas substâncias além de manter a pele em contato com o ativo por longo período de tempo (KAUR et al., 2007). Tais características tornam este sistema de liberação bastante adequado para uso em formulações cosméticas em comparação com formulações tradicionais (MULLER et al., 2002; BORGIA et al., 2005).

Neste sentido, neste trabalho, além de analisarmos a atividade antioxidante do extrato, fração e substâncias isoladas da planta, testamos preliminarmente a encapsulação das substâncias em partículas poliméricas e lipídicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a propriedade antioxidante e inibidora da tirosinase *in vitro* de substâncias extraídas da casca morta do caule da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze da família Araucariaceae, e incorporar em partículas biodegradáveis a substância que apresentar melhor atividade, no intuito de dar início ao desenvolvimento de uma formulação cosmética.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de oxidação das substâncias extraídas da casca morta da *A. angustifolia*
- Avaliar a citotoxicidade em células B16F10 das substâncias extraídas da casca morta da *A. angustifolia*
- Investigar a capacidade das substâncias extraídas da casca morta da *A. angustifolia* em:
 - Reduzir o radical DPPH
 - Proteger membranas lipídicas contra a peroxidação induzida pela radiação UV
 - Proteger membranas lipídicas contra a peroxidação induzida pelos radicais hidroxila e ascorbila
 - Inibir a tirosinase isolada
 - Inibir a tirosinase em cultura de células produtoras de melanina (B16F10)
- Incorporar a substância mais ativa em partículas biodegradáveis, determinar o tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e perfil de liberação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

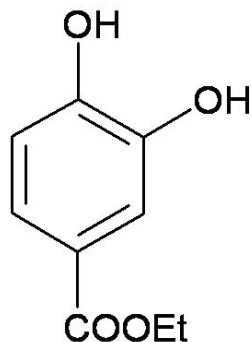
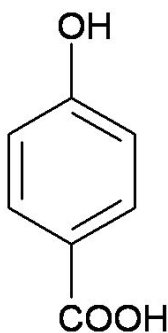
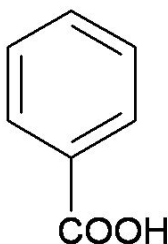
O DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) p.a., l- α -phosphatidylcholine (L- α -Lecithin), ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, tirosinase, l-tirosina, melanina e o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), foram adquiridos da Sigma Aldrich. O meio de cultura Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM), e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil); a penicilina e a estreptomicina foram compradas da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfóxido (DMSO) e os demais solventes, reagentes (sais, tampões etc) e equipamentos foram os disponíveis no laboratório e são rotineiramente utilizados nas linhas de pesquisa do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas.

As substâncias isoladas da araucária (SIAA) são:

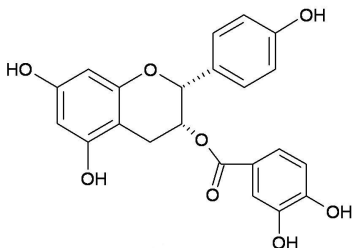
Ácido benzóico
($C_7H_6O_2$; PM=122)

Ácido *p*-
hidroxibenzóico
($C_7H_6O_3$; PM=138)

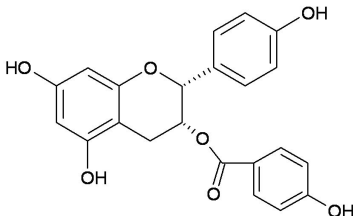
Ácido protocatéquico
($C_7O_4H_6$); PM=154)



Epiafzelequina esterificada com
ác. protocatéquico
(C₂₂H₁₈O₈; PM=410)



Epiafzelequina esterificada com
ác. *p*-hidroxibenzóico
(C₂₂H₁₈O₇; PM=394)



4.2 MÉTODOS

4.2.1 Isolamento e identificação dos compostos fenólicos

Os dados referentes ao isolamento e identificação dos compostos fenólicos avaliados neste estudo nos foram fornecidos pela Prof^a. Dr^a. Maíque Weber Biavatti, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e responsável pela obtenção dos mesmos.

A casca morta da *Araucaria angustifolia* foi coletada em uma fazenda experimental na cidade de General Carneiro (Pr), contendo 17,68% de umidade e após a secagem natural o teor de umidade caiu para 12,77%. O material triturado (5-2 mm) foi percolado (1:2) com etanol-água (50 a 70 °C), depois foi centrifugado para obter o extrato líquido hidroalcoólico com 25% de resíduo seco, que foi concentrado para obter 10% de resíduo seco.

O extrato bruto hidroalcoólico concentrado (EHB) foi particionado com acetato de etila, fornecendo a fração acetato (FA), que foi submetida a uma coluna cromatográfica usando sílica gel e um gradiente de diclorometano-metanol (95:5 a 5:95) como eluente para fornecer os seguintes compostos: ácido benzóico (AB), ácido *p*-hidroxibenzóico (PHA), ácido protocatéquico (AP) e quercetina. Além disso, o mesmo sistema de coluna cromatográfica foi empregado com frações impuras acima para isolar duas catequinas: *epiafzelequina* esterificada com ácido *p*-hidroxibenzóico (EAB) e *epiafzelequina*

esterificada com ácido protocatéquico (EAP). As últimas frações do processo de separação prévia foram submetidas à coluna cromatográfica utilizando celulose e etanol como eluente para fornecer epicatequina (não avaliada neste estudo). As estruturas das substâncias isoladas foram identificadas por análise de ressonância magnética nuclear.

4.2.2 Monitoramento radical DPPH

O monitoramento do radical DPPH foi realizado segundo o método descrito por VIVOT et al. (2001) com algumas modificações. Resumidamente, as amostras foram solubilizadas em etanol. O extrato bruto e a fração acetato de etila (0,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) bem como as substâncias isoladas (0,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μM) foram incubadas por 5 min a 25°C com uma solução etanólica de DPPH na concentração de 20 μM com posterior leitura da absorvância a 517 nm em espectrofotômetro Pharmacia/LKB Ultospec III. A quercetina foi usada como padrão. O percentual de reatividade da amostra testada sobre os radicais DPPH foi calculado através de comparação com o grupo controle considerando este como 100% de radicais DPPH no meio de reação. A IC_{50} , foi calculada através do Plote de Hill.

4.2.3 Voltametria cíclica

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT30 potentiostat/galvanostat (Eco Chemie) acoplados a um computador com o programa GPES 4.9, a uma velocidade de varredura de 100 $\text{mV}.\text{s}^{-1}$, em uma solução carreadora de tampão fosfato (0,1M; pH 6). As amostras foram solubilizadas em etanol e testadas, imediatamente após sua preparação, nas concentrações de 30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (extrato bruto e fração acetato de etila) e de 30 μM (substâncias isoladas). As medidas foram feitas usando um sistema de três eletrodos constituído por um eletrodo de trabalho (pasta de carbono), eletrodo auxiliar (platina) e um eletrodo de referência (Ag/AgCl). A quercetina foi usada como padrão na concentração de 30 μM .

4.2.4 Síntese do radical ascorbila

O radical ascorbila foi produzido através da reação entre 0,025 mM de FeSO_4 e 0,50 mM de ácido ascórbico no meio de reação (CASALINO et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2003).

4.2.5 Síntese de radical hidroxila

Este radical foi produzido pela reação de Fenton, através do sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ / Ascorbato adaptado de Halliwell et al. (1987). Ao meio de reação foram adicionados os seguintes reagentes: 20 μM FeCl_3 , 2,8 mM H_2O_2 e 100 μM de ácido ascórbico sendo incubado a 37 °C por 30 min com e sem as amostras.

4.2.6 Obtenção de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico

Em um balão de vidro, foram dissolvidos 25 mg de fosfatidilcolina de soja em 1 ml de clorofórmio, posteriormente o solvente foi removido sob gás nitrogênio formando um filme lipídico. Em seguida, o sistema foi deixado sob vácuo por 1 h para a completa evaporação do solvente orgânico. O filme formado foi então, reidratado com tampão Tris HCl (0,1 M; pH 7,4) e agitado vigorosamente em um agitador tipo vortex Phoenix/AP-56, para o desprendimento do filme lipídico da parede do vidro e formação da suspensão de lipossomas (HOPE et al., 1986; WILSCHUT; HOEKSTRA, 1986).

4.2.7 Medida da lipoperoxidação pelo método das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método caracteriza-se pela formação de produto de coloração rósea a partir da reação entre malonildialdeído (MDA), composto majoritário resultante da lipoperoxidação, e o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH ácido, propiciado pela adição de ácido tricloroacético no meio. Desta forma, quanto maior a absorvância a 540 nm, maior a extensão do dano lipoperoxidativo (OHKAWA et al., 1979; BIRD; DRAPER, 1984; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

4.2.8 Lipoperoxidação induzida pela radiação UV

A lipoperoxidação induzida por UV foi realizada utilizando como alvo lipossomas de fosfatidilcolina de soja, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. As amostras foram solubilizadas em etanol e o mesmo volume de etanol foi adicionado aos controles. O meio de reação, na presença ou ausência das amostras (Extrato bruto e fração acetato de etila 0,05; 0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 500 e 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e substâncias isoladas 0,05; 0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 500 e 1000 μM), além dos lipossomas (25mg /mL) em solução tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4), foi exposto à radiação UV gerada por uma lâmpada germicida (254 nm) colocada a 10 cm de distância das amostras por 1 h contra um controle não exposto à radiação (MANDAL e CHATTERJEE, 1980). A peroxidação lipídica foi determinada pelo método TBARS. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm por 5 min) e o sobrenadante lido em 540 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em porcentagem, tomando-se os valores médios das absorvâncias dos ensaios controle como 100% de peroxidação. A IC_{50} , foi calculada através do Plote de Hill (Graphpad prism 4).

4.2.9 Lipoperoxidação induzida por radicais livres

A lipoperoxidação foi induzida pelos radicais ascorbila e hidroxila, através da geração destes radicais no meio de reação contendo lipossomas (25 mg/mL de fosfatidilcolina de soja) e de tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4), na presença e na ausência das amostras (extrato bruto e fração acetato de etila 0,05; 0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 500 e 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e substâncias isoladas 0,05; 0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 500 e 1000 μM) em estudo contra um controle não exposto aos radicais livres. As amostras foram solubilizadas em etanol e o mesmo volume de etanol foi adicionado aos controles. As amostras e os controles foram incubados durante 30 min a 37°C e a extensão do dano lipoperoxidativo nas membranas foi avaliado através do método TBARS. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm por 5 min) e o sobrenadante foi lido em 540 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em porcentagem, tomando-se os valores médios das absorvâncias dos ensaios controle como 100% de peroxidação. A IC_{50} , foi calculada através do Plote de Hill.

4.2.10 Preparação de microssomas de fígado de rato

Os microsomas foram obtidos por centrifugação diferencial com agregação de cálcio. Os fígados foram homogeneizados numa concentração de 16,7% em tampão Tris-sacarose 10 mM, pH 7,4 e centrifugados a 600 g por 5 min em centrífuga refrigerada a 0 °C. A fração mitocondrial foi obtida centrifugando o sobrenadante a 12000 g por 10 min. A fração microssomal foi obtida pela precipitação do sobrenadante pós-mitocondrial com CaCl_2 80 mM. O precipitado foi lavado com KCl 15 mM/ Tris 10 mM pH 7,4 e centrifugado a 25000 g por 15 min. Os microssomas lavados foram ressuspensos com tampão de conservação contendo glicerol (SCHENKMAN e CINTI, 1978). Uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração de proteína. O restante foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido para posterior determinação de atividade antioxidante.

4.2.11 Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína foi realizada em triplicatas em placa de 96 poços pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). As amostras foram incubadas com Na_2CO_3 1% , NaOH 0,2%, tartarato de sódio 1% e CuSO_4 0,5%) por 10 min em temperatura ambiente. O reagente de Folin diluído (1:5) (15 μl) foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas em 750 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

4.2.12 Lipoperoxidação em microsomas de fígado de rato induzida pelo radical ascorbila

A lipoperoxidação em microsomas de fígado de rato foi induzida pelo sistema Fe^{2+} /Ascorbato. Ao meio de reação, contendo 2 mg.mL⁻¹ de proteína microssomal e Tampão Tris-HCL (0,1 M; pH 7,4), foram adicionados 25 μM de FeSO_4 e 500 μM de Ascorbato (SANZ et al., 1994). A amostra que apresentou a menor IC_{50} nos ensaios em lipossomas (EAP) foi incubada a 37 °C por 20 min e a lipoperoxidação foi determinada pelo método de TBARS, e monitorada espectrofotometricamente em 535 nm (BIRD e DRAPER, 1984; OHKAWA et al., 1979). Os resultados foram expressos em porcentagem, tomando-se os valores médios das absorvâncias dos ensaios controle como 100% de peroxidação. A IC_{50} , foi calculada através do Plote de Hill.

4.2.13 Lipoperoxidação em microsomas induzida pela radiação UV

A lipoperoxidação em microsomas de fígado de rato induzida por UV foi realizada expondo o meio de reação, com e sem a amostra que apresentou a melhor IC₅₀ nos ensaios em lipossomas (EAP) nas concentrações de 0,05; 0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100; 500 e 1000 µM) e os microsomas (2mg.ml⁻¹ de proteína microsomal) em solução tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4) foi exposto à radiação UV gerada por de uma lâmpada germicida (254 nm) colocada a 10 cm de distância das amostras por 1 h, contra um controle não exposto à radiação (MANDAL e CHATTERJEE, 1980). A peroxidação lipídica foi determinada pelo método TBARS. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm por 5 min) e o sobrenadante foi monitorado em 540 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em porcentagem, tomando-se os valores médios das absorbâncias dos ensaios controle com 100% de peroxidação. A IC₅₀, foi calculada através do Plote de Hill.

4.2.14 Ensaio colorimétrico de inibição da tirosinase

As amostras foram solubilizadas em etanol de modo a obter-se no meio de reação uma concentração final de 1, 10, 25, 50, 100 µg.ml⁻¹ para o extrato bruto e fração acetato de etila e de 1, 10, 25, 50, 100 µM para substâncias isoladas. A tirosinase de cogumelo (Sigma), foi solubilizada em tampão fosfato pH=6,8. A hidroquinona foi usada como controle positivo para inibição da tirosinase. As amostras foram incubadas por 5 min a 25 °C com 47,57 U/ml de tirosinase . Após esta incubação foram adicionados 1,04 mM de l-tirosina e foi monitorada uma cinética a cada minuto durante 30 minutos em espectrofotômetro UV-VIS (Single Beam model SB-1810S - Spectro Vision). num comprimento de onda de 475 nm (MOMTAZ et al., 2008). O percentual de inibição foi calculado pela equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{\text{absrvância amostra}}{\text{absorvância controle}} \times 100$$

4.2.15 Inibição da tirosinase em cultura de células B16F10

Células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM HEPES (pH 7,4) a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.2.16 Medida do conteúdo de melanina

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de seis poços (35 mm de diâmetro) com 1×10^5 células/poço. Após 24 horas de incubação o meio de cultura foi substituído pelas soluções das amostras, preparadas também em meio de cultura, nas concentrações de 0,25; 2; 8 e 10 µM e incubadas por mais 72 h. O meio de cultura foi então removido e reservado, as células foram lavadas duas vezes em PBS e posteriormente soltas por tripsinização. As células foram centrifugadas e as membranas celulares do pellet foram dissolvidas em tampão de lise contendo Triton X-100 0,5%. A melanina sintetizada foi então purificada e precipitada com ácido tricloroacético 6% (centrifugação por 20 min a 15000 rpm, 4 °C). A melanina purificada foi ressuspensa em 500 µl de NaOH 1 M por 2h a 100°C. A absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro a 475 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem, tomando-se os valores médios das absorvâncias dos ensaios controle como 100% de melanina (KAWANO et al., 2007). Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.

4.2.17 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular da linhagem B16F10 foi avaliada pelo método do MTT (MOSMANN, 1983). O sal de tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan de cor azulada, pela atividade oxidativa das células, funciona como um indicador de viabilidade celular. 1×10^4 células foram incubadas por 48 horas, em triplicata, com as amostras, em placas de 96 poços. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado um novo meio contendo o MTT (0,25 µg/µl) seguido de incubação por 2 h, a 37 °C. Este meio foi retirado e o precipitado formazan foi dissolvido com DMSO. O formazan formado foi medido em 540 nm, com o uso de um leitor de microplacas. A densidade óptica, obtida do grupo controle, células sem tratamento, foi considerado como 100% de células viáveis.

4.2.18 Preparação das nanopartículas lipídicas

Esta etapa do trabalho teve a colaboração da Dr^a. Betina G.Z. Ramos. As nanopartículas lipídicas foram preparadas pela técnica de homogeneização a quente (VENKATESWARLU e MANJUNATH, 2004). Basicamente, esta técnica consistiu em fundir o lipídeo e dispersá-lo, sob agitação vigorosa, em uma fase aquosa contendo um estabilizante hidrofílico, previamente aquecida numa temperatura 5° C acima da temperatura de fusão do lipídeo. Após a formação de uma emulsão finamente dividida, através do uso de uma sonda de ultra-som, a mistura foi resfriada até temperatura ambiente para endurecimento e formação das nanopartículas. Para a preparação das nanopartículas contendo o princípio ativo, FA foi adicionada na fase lipídica da formulação. Condições de preparação tais como amplitude e tempo de ultra-sonificação foram modificados para a obtenção de partículas com tamanho apropriado em torno de 140 nm. As formulações foram designadas como F.3, F.4 e F.5 e não terão seus componentes divulgados por razões de patenteamento.

4.2.19 Preparação das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pelo método de emulsificação evaporação do solvente. Resumidamente, uma fase interna composta por acetona, polímero e a fração acetato foram gotejadas sobre uma fase externa sob agitação de 1000 rpm por 24 h para a evaporação do solvente e a formação das partículas. Posteriormente a formulação foi filtrada e as partículas secaram naturalmente. As formulações obtidas por este método foram denominadas de F.1 e F.2.

4.2.20 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersidade, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

4.2.20.1 Determinação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta.

Estes parâmetros foram determinados por de espalhamento de luz dinâmico no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments),

modelo ZEN 3600, equipado com um laser de 633 nm (He-Ne; 4 mW) que opera na faixa de 0,6 a 6000 nanômetros. As amostras foram diluídas dez vezes em água destilada, colocadas em cubetas especiais para a medida do potencial zeta e posteriormente lidas para os três parâmetros citados.

4.2.20.2 Eficiência de encapsulação

A fração acetato (na forma de pó) foi diluída em etanol nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Foi realizado um espectro de absorção de cada uma destas diluições em espectrofotômetro UV-VIS, na faixa de 190 a 400 nm. Foram realizadas duas curvas de calibração a partir dos referidos espectros de absorção, nos comprimentos de onda de 224 e 280 nm. A eficiência de encapsulação foi medida por espectrofotometria e calculada pela equação da reta ($y = a.x + b$). Ao término de cada formulação foi retirada uma alíquota da suspensão de nanopartículas, que foi filtrada pelo método de ultrafiltração centrifugação em filtro equipado de membrana durapore com poros de 0,1 μm de diâmetro (Ultrafree®-MC Millipore). O sobrenadante obtido pela filtração foi diluído em etanol e lido em espectrofotômetro a 224 e 280 nm. O branco consistiu no filtrado de uma formulação de nanopartículas brancas diluído em etanol em concentração igual à da amostra em questão.

4.2.21 Análise estatística

Os resultados foram calculados, no programa estatístico Prisma 4, pela média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata e $n=3$. A avaliação estatística, quando aplicada, foi feita pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste t (Bonferroni). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.1.1 Reatividade com DPPH

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações retarda ou evita de forma significativa a oxidação do substrato (HALLIWELL, B, 1995).

A atividade antioxidante das substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* (SEAA) foi avaliada por diferentes métodos. Primeiramente foi realizada uma triagem das amostras pelo método do DPPH, um radical estável e independente de qualquer atividade enzimática, que produz uma solução de cor violeta quando em solução etanólica. Este radical é reduzido na presença de uma molécula antioxidante, o que resulta na descoloração do meio de reação (CHOI et al., 2002; MENSON, et al., 2001, RUSSO et al., 2000). Neste teste todas as amostras apresentaram alguma atividade antioxidante (Fig.8).

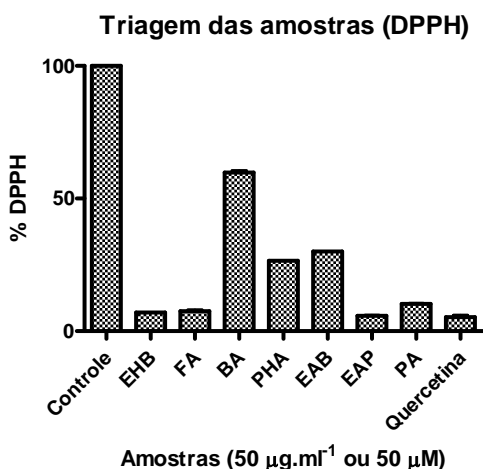


Figura 8: Triagem, pelo método do DPPH, das SEAA. As amostras estão na concentração de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para EHB e FA e 50 μM para as SI.

A partir deste resultado, todas as amostras foram submetidas ao ensaio por este método para a determinação das respectivas IC_{50} , que

foram calculadas através do Plot de Hill, no qual Bottom = platô inferior; Top = platô superior; Hill Slope = inclinação da curva (esquema 4; figura 9).

$$y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(LogIC_{50} - X)(HillSlope)}}$$

Esquema 5

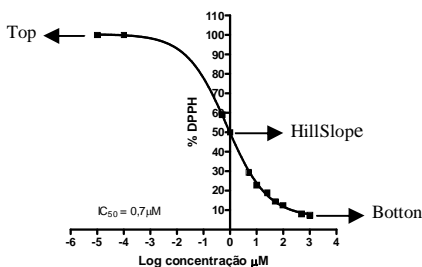


Figura 9: Representação gráfica da obtenção das IC_{50} de EAP para o método de DPPH pelo plot de Hill. Todas as demais IC_{50} dos ensaios de DPPH e lipoperoxidação foram calculados da mesma forma.

Apesar de todas as amostras terem apresentado atividade sequestradora de radicais livres de maneira concentração-dependente, é possível verificar já na triagem que o EHB e a FA apresentaram alta atividade antioxidante.

De acordo com Saija et al. (1995), nos flavonóides, três grupos estruturais são determinantes para a atividade sequestradora de radicais livres e/ou potencial antioxidante: 1) a *o*-dihidroxi (catecol) do anel B; 2) a dupla ligação 2-3 em conjugação com a função 4-oxo e 3) a presença de grupos hidroxila nas posições 3, 5 e 7. A quercetina apresenta estes três requisitos estruturais, enquanto EAP apresenta apenas uma hidroxila na posição 4' do anel B, a hidroxila da posição 3 sofreu esterificação com o ácido protocatético (2 hidroxilas), o qual provavelmente é o responsável pelo aumento da atividade antioxidante visto que EAB apresenta estrutura semelhante mas a hidroxila da posição 3 está esterificada com o ácido *p*-hidroxibenzóico que possui

uma hidroxila apenas. Em ordem decrescente a atividade antioxidante das SI foi EAP > FA > EHB = AP > PHA > AB (tabela 2).

Considerando que o comportamento eletroquímico das substâncias em estudo depende de características estruturais como o número e posição de hidroxilas fenólicas, foram também realizados ensaios de voltametria cíclica (Figura 11 e Tabela 2), um método simples, para determinar o potencial de oxiredução das amostras.

Tabela 2: Atividade antioxidante das SEAA por DPPH e VC.

Amostras	Reatividade c/ DPPH IC ₅₀		Voltametria cíclica	
	$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	μM	Potencial de Oxidação (mV)	Potencial de Redução (mV)
EHB	$1 \pm 0,10$	-	286	186
FA	$0,9 \pm 0,15$	-	286	189
AB	-	> 50	391	-
PHA	-	10 ± 3	358	436
AP	-	$1 \pm 0,05$	522; 817	69
EAB	-	11 ± 3	339	-
Quercetina*		$0,6 \pm 0,05$	229	196
EAP	-	$0,7 \pm 0,05$	283; 673	182

Os resultados foram calculados pela média \pm desvio padrão (n=3).*Padrão.

As condições ideais para este ensaio foram obtidas a partir de triagens prévias de pH da solução carreadora, velocidade de varredura e concentração das amostras. Obtiveram-se então os seguintes parâmetros: a solução carreadora foi o tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 e a velocidade de varredura foi de $100 \text{ mV}.\text{s}^{-1}$, EHB e FA foram utilizados na concentração de $30 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e as SI a $30 \mu\text{M}$. O eletrodo de trabalho foi o de pasta de carbono, o de referência, Ag/AgCl e o contra eletrodo, de platina.

Os voltamogramas obtidos confirmaram, na maioria dos casos, os resultados obtidos pelo método do DPPH (Tabela 2 e Figura 10).

O potencial de oxidação de uma substância fornece uma estimativa da energia necessária para doar um elétron e, portanto, quanto

menor for o potencial de oxidação de uma substância, mais facilmente ela doará um elétron e maior será a atividade antioxidante esperada (MANNINO et al., 1998).

Considerando o flavonol quercetina, usado como padrão para estes ensaios, as hidroxilas presentes no anel B são os principais responsáveis por sua capacidade antioxidante, sendo assim estas hidroxilas são responsáveis pelo seu pico de oxidação em 229 mV nas condições deste ensaio (COSIO et al., 2006). A catequina EAP apresentou pico em 283 mV enquanto EAB apresentou pico em 339 mV, e parece indicar que o substituinte da hidroxila na posição 3 do anel C seria o responsável por estes picos.

Os ácidos fenólicos simples foram os que apresentaram os maiores potenciais sendo portanto os de menor atividade antioxidante.

A atividade antioxidante do ácido *p*-hidroxibenzóico não se dá em termos de capacidade doadora de hidrogênios contra radicais gerados em fase aquosa e está portanto, relacionado com o potencial de ionização (retirada de elétrons) do único grupo funcional carboxila sobre o anel fenólico afetando as posições *ortho* e *para*.

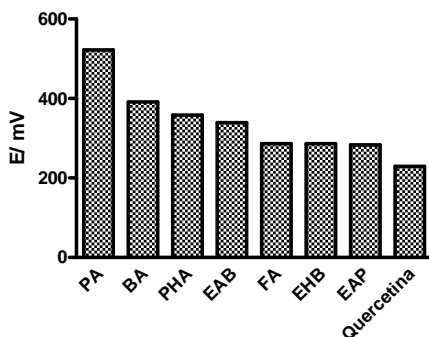


Figura 10: Corrente de pico anódico (oxidação) das substâncias extraídas da AA em mV. Quercetina como padrão a 30 μ M.

Os derivados do ácido dihidroxibenzóico mostram uma atividade antioxidante dependente da posição dos grupos hidroxila no anel. O ácido protocatéquico (ácido 3, 4-dihidroxi benzóico) por apresentar hidroxilação na posição *meta* e *para* apresenta atividade antioxidante maior do que por exemplo o ácido 2, 3-dihidroxi benzóico. Parece que a proximidade dos substituintes *ortho* difenólicos, do $-\text{CO}_2\text{H}$, influencia a disponibilidade de hidrogênios, sendo que hidrogênios na posição *meta*,

são mais efetivos. A exemplo do ácido 3,5-dihidroxi benzóico que apresenta atividade aumentada em relação ao anterior (RICE-EVANS et al., 1996).

Avaliando comparativamente, na Tabela 2, EAB e PHA, EAP e AP, pode-se verificar uma semelhança de atividade antioxidante tanto por DPPH quanto por VC, o que possibilita sugerir que os substituintes da hidroxila na posição 3 seriam provavelmente os responsáveis pela atividade antioxidante nestas moléculas.

5.1.2 Ensaios de lipoperoxidação em lipossomas

A lipoperoxidação nada mais é do que a oxidação, mediada por espécies reativas, dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas.

Existe uma relação entre a composição lipídica e estado físico das membranas celulares e a conformação e atividade de enzimas dos receptores. Os lipídios que constituem as membranas podem ser quimicamente modificados por espécies reativas, o que resulta na alteração de suas funções e características. Tais alterações acabam por comprometer a permeabilidade das membranas celulares ao cálcio, bem como ocasionam danos às proteínas e receptores, comprometendo a organização e o metabolismo celular (REITER, 1998; YIN et al., 1998).

Os lipossomas, por possuírem características similares às membranas biológicas, porém controláveis, são aceitos como modelo de membrana para o estudo *in vitro* da lipoperoxidação (CASTELLI et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2003; DE LIMA et al., 2004).

As SEAA foram avaliadas por sua capacidade de proteger contra a lipoperoxidação das bicamadas lipídicas de lipossomas de fosfatidilcolina de soja. Neste estudo, a lipoperoxidação foi induzida pela radiação ultravioleta (UV), e pelos radicais hidroxila e ascorbila.

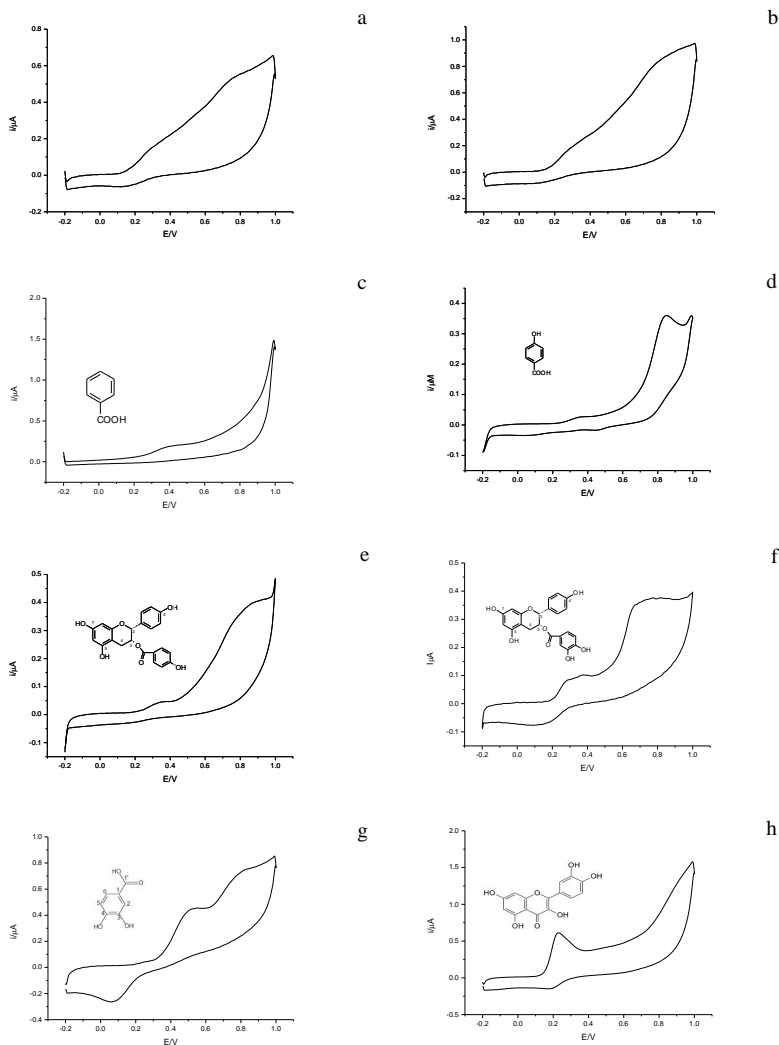


Figura 11: Voltamogramas cíclicos das SEAA e da quercetina (padrão). Condições do ensaio: amostras a $30 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ou $30 \mu\text{M}$, solução carreadora: tampão fosfato (0,1 M pH 6,0), velocidade de varredura: 100 mV.s^{-1} a) EHB; b) FA; c) AB; d) PHA; e) EAB; f) EAP; g) AP; h) Quercetina.

A exposição à radiação UV provoca a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), causando dano oxidativo (OKADA et al.,

1994). Dentre estas EROS encontra-se o radical hidroxila, produzido pela reação de Fenton, que por apresentar o tempo de meia vida mais curto, é o mais reativo dos radicais, e reage amplamente com aminoácidos, fosfolipídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico e ácidos orgânicos (ANDRADE, et al., 2005). Já o radical ascorbila, é também gerado através da reação de Fenton por íons Fe (III) ou Cu^{2+} e pode ser inibido por um quelante de metais (ITO et al., 2007; MENDITTO et al., 1997; MAURICIO et al., 2003). Este radical apresenta um tempo de meia vida longo comparado a outros radicais e é usado como marcador de estresse oxidativo no plasma através da relação entre conteúdo de ascorbila/ascorbato (PUNTARULO, 2005; GALLEANO et al., 2002; COURDEROT-MASUYER et al., 2000).

A extensão da lipoperoxidação foi monitorada pela formação de espécies que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e as SEAA foram submetidas a uma triagem frente aos três indutores de lipoperoxidação. A concentração de corte utilizada nas triagens foi de 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ para EHB e FA e de 50 μM para as SI. A maior parte das SEAA apresentaram algum tipo de atividade frente aos três indutores da lipoperoxidação avaliados neste trabalho. Desta forma, foram realizados ensaios para cada substância isoladamente adicionando concentrações crescentes das mesmas em comparação com um grupo controle (ausência de antioxidante) e outro grupo de controle basal, sem a fonte de oxidação (radiação UV, radical hidroxila e radical ascorbila) e sem o composto, para avaliar a peroxidação basal dos lipossomas. Os ensaios foram feitos em triplicata e $n=3$.

Avaliando os resultados obtidos nos ensaios de lipoperoxidação (Tabela 3), é possível observar que a FA obteve a IC_{50} mais baixa frente às três fontes indutoras da lipoperoxidação.

Além das características estruturais que conferem aos flavonoides uma atividade sequestradora de radicais livres, como citado anteriormente no item 5.1.1, os flavonoides apresentam também a propriedade de se ancorar, através de suas ligações químicas, à cabeça polar dos fosfolipídeos formando complexos físico-químicos reversíveis, pode-se então sugerir que, dependendo da sua lipossolubilidade, existe uma relação entre interação do flavonoide com modelos de membrana e formação de complexos flavonoide-fosfolipídeo (SAIJA et al., 1995; BOMBARDELLI et al., 1991).

5.1.2.1 Proteção contra a lipoperoxidação induzida pela radiação UV

As substâncias foram avaliadas pela sua capacidade de proteger a bicamada lipídica lipossomal da lipoperoxidação induzida pela radiação UV. Após uma hora de exposição à luz UV, houve um aumento significativo da produção de espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). E as substâncias promoveram uma proteção da membrana lipossomal de maneira concentração-dependente, visto que, com o aumento da sua concentração houve uma redução de TBARS.

Há evidências relacionando espécies reativas de oxigênio com a degradação dos fosfolipídeos por radiação UV (OKADA et al., 1994). É possível então observar, que EHB, FA e EAP apresentaram alta atividade antioxidante, relacionando então o efeito protetor das SEAA contra a lipoperoxidação por UV, com a capacidade sequestradora de espécies reativas previamente avaliadas por ensaios de DPPH e VC. A relação estrutura/atividade destas substâncias foi anteriormente discutida no item 5.1.1.

Tabela 3: Lipoperoxidação induzida por UV, ascorbila e hidroxila.

SEAA	Lipoperoxidação					
	Radiação UV		Ascorbila		Hidroxila	
	(IC ₅₀)		(IC ₅₀)		(IC ₅₀)	
	µg.ml ⁻¹	µM	µg.ml ⁻¹	µM	µg.ml ⁻¹	µM
EHB	36 ±3	-	18 ±1	-	12 ±1,5	-
FA	25 ±2,5	-	17 ±1	-	22 ±2	-
AB	-	> 50	-	> 50	-	> 50
PHA	-	> 50	-	> 50	-	> 50
AP	-	> 50	-	> 50	-	> 50
EAB	-	> 50	-	> 50	-	> 50
EAP	-	21 ±2	-	35 ±5	-	> 50
Quercetina*	-	9 ±1	-	30 ±2	-	> 50

Valores calculados pela média, ± desvio padrão e n=3. * Padrão.

O radical hidroxila formado nesta reação é uma espécie muito reativa e apresenta um tempo de meia-vida curto. Este radical reage com a maioria dos compostos orgânicos, podendo reagir rapidamente com o solvente o que resulta em radicais livres secundários que podem ser suprimidos pelos flavonóides (YAMAGUCHI et al., 2005).

Um estudo realizado por Mandal e Chatterjee (1980), mostrou que o extravasamento da membrana do lipossoma é causado diretamente

pela exposição à luz UV ou à luz solar. Mostrou também que com o aumento da intensidade da radiação, houve um aumento concomitante do extravasamento da membrana e da lipoperoxidação, o que lhes permitiu estabelecer uma relação direta entre estas duas propriedades da membrana. Observa-se assim a importância da metodologia e dos resultados obtidos com a mesma avaliando as substâncias estudadas neste trabalho.

5.1.2.2 Proteção contra a lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila

Numa triagem realizada previamente foi observado que na lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila, as SEAA apresentaram a menor atividade dentre as três fontes indutoras. Porém as substâncias que apresentaram maior atividade, mantiveram uma IC_{50} na mesma faixa da lipoperoxidação induzida pelo radical hidroxila (Tabela 3).

A capacidade protetora da lipoperoxidação de EAP foi avaliada também em microsomas de fígado de rato, contra o radical ascorbila e radiação UV e apresentou IC_{50} de $6 \pm 0,25 \mu M$ e $18 \pm 4 \mu M$, respectivamente. Estes resultados confirmam a alta atividade protetora da lipoperoxidação, uma vez que os microsomas possuem uma composição de proteínas, metais, antioxidantes intrínsecos entre outros (CASALINO et al., 1996), que podem atuar como interferentes.

5.1.2.3 Proteção contra a lipoperoxidação induzida pelo radical hidroxila

O radical hidroxila, é o que apresenta maior instabilidade na configuração eletrônica e por isso é o mais reativo dentre as EROS. Quanto maior for a instabilidade do radical, maior será a velocidade com a qual retirará elétrons de outras moléculas.

Os resultados obtidos previamente através de uma triagem (dados não mostrados) mostraram que à exceção do BA, todas as substâncias apresentaram alguma atividade antioxidante contra o radical hidroxila. Como nossa concentração de corte foi de $50 \mu M$, observamos que nenhuma das SI apresentou IC_{50} maior ou igual a esta concentração. Apenas o EHB e a FA apresentaram IC_{50} de $12 \pm 1,5 \mu g.ml^{-1}$ e $22 \pm 2 \mu g.ml^{-1}$, respectivamente.

5.2 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA TIROSINASE

5.2.1 Ensaio colorimétrico de inibição da tirosinase

A tirosinase é a enzima chave na biossíntese de melanina. Está localizada no melanossoma dos melanócitos e é ativada pela radiação UV.

As SEAA foram submetidas a uma triagem na concentração de $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para EHB e FA (Figura 12) e de $50 \mu\text{M}$ para as substâncias isoladas como mostra a figura 13, e com exceção de AP e EAP, todas as substâncias inibiram a síntese de melanina em relação ao controle sem amostra. Foi usada a hidroquinona como controle positivo para inibição da síntese de melanina.

As substâncias AP e EAP apresentaram uma característica que inviabilizou a determinação do $K_{0,5}$. Ao adicionar a tirosinase ao meio de reação contendo AP e EAP, ocorreu a formação imediata de uma coloração amarelada que apresentou absorção no mesmo comprimento de onda (475 nm) da melanina e fez com que as curvas no gráfico, ficassem acima da curva do controle 100% de melanina.

As amostras foram adicionadas ao meio de reação (tampão fosfato 0,1 M pH 6,8) nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, para EHB e FA e 1, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{M}$ para as substâncias isoladas exceto EAP e AP. Na sequência foi adicionada a tirosinase (47,57 U/ml ao meio de reação) seguida de um período de incubação de 5 minutos a 25°C . O substrato (l-tirosina 1,074 mM) foi adicionado por último iniciando a reação de síntese de melanina que foi monitorada através de uma cinética durante 30 min.

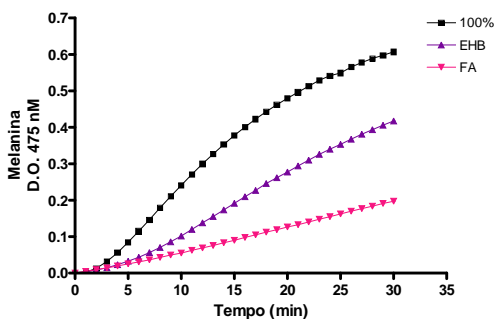


Figura 12: Gráfico que representa o comportamento de EHB e FA na concentração de $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ numa cinética de avaliação da atividade da tirosinase isolada monitorada por 30 min.

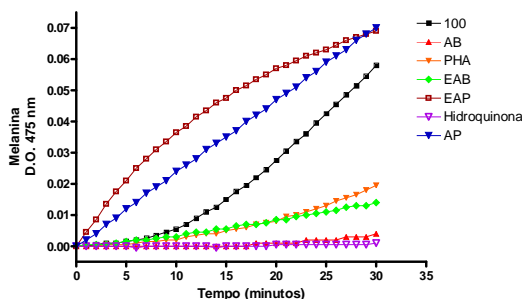


Figura 13: Gráfico que representa o comportamento das SI a 50 μM numa cinética de avaliação da atividade da tirosinase monitorada por 30 minutos. A hidroquinona foi usada como padrão de inibição também na concentração de 50 μM .

Os resultados obtidos (Tabela 4) mostram que dentre as substâncias isoladas, EAB foi a substância que apresentou maior atividade inibidora da tirosinase seguida de $\text{AB} > \text{PHA}$ e entre as demais amostras FA foi mais ativa do que EHB. Tendo em vista estes resultados promissores, optamos por testar estas substâncias em linhagem de células B16F10 (melanócitos de melanoma de pele de camundongo), que são células produtoras de melanina, para ver se ocorreria inibição da síntese de melanina da mesma forma.

Tabela 4: Inibição da tirosinase isolada

Amostras	$K_{0,5}$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$K_{0,5}$ (μM)
EHB	30 ± 4	-
FA	21 ± 2	-
AB	-	9 ± 1
PHA	-	$32 \pm 2,5$
AP	-	nd
EAB	-	8 ± 3
EAP	-	nd

Hidroquinona como padrão positivo ($K_{0,5}$ de $3 \pm 0,25$ μM). Resultados calculados pela média \pm desvio padrão ($n=3$); nd = não determinado.

5.2.2 Viabilidade celular (B16F10)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, um sal de tetrazólio de cor amarela que é reduzido a formazan, de cor azulada, pela atividade oxidativa das células funcionando como um indicador de viabilidade celular. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo 1×10^4 células por poço e incubadas por 48h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . As substâncias foram testadas em concentrações de 0, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ para EHB e FA e 0, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{M}$ para as demais substâncias isoladas.

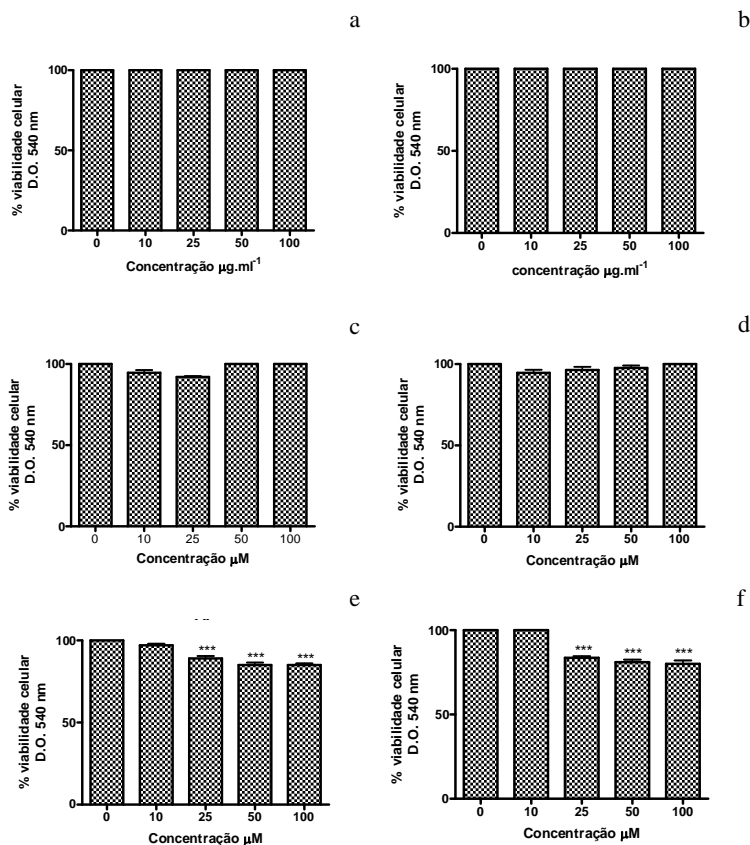


Figura 14: Viabilidade celular após incubação de 48h com as SEAA. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada barra representa a Média \pm desvio padrão (n=3). Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o

controle, usando ANOVA, seguido de teste t (Bonferroni). a) EHB; b) FA; c) AB; d) PHA; e) AP; f) EAP.

Os resultados mostraram 100% de viabilidade celular para EHB, FA e AB em todas as concentrações testadas. Para as demais substâncias a viabilidade ficou entre 80 e 100% de maneira concentração dependente (Figura 14), sendo que para as concentrações de 0 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 0 a 10 μM nenhuma das substâncias apresentou toxicidade significativa.

5.2.3 Ensaio de inibição da tirosinase em células B16F10

Os ensaios de inibição da tirosinase em células B16F10 foram realizados em placas de 6 poços (35 mm de diâmetro/ poço) com 1×10^5 células/poço. Inicialmente foram testadas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para EHB e FA e 1, 10, 25, 50 e 100 μM para as substâncias isoladas, mas nestas concentrações não foi possível observar a inibição, porque ao contrário do que esperávamos, a quantidade de melanina diminuiu a 1 μM de amostra e aumentou nas concentrações subsequentes, sugerindo um possível estímulo da melanogênese nestas concentrações. Estes ensaios foram repetidos para certificar se este comportamento manter-se-ia. Observou-se então que o aumento da melanina em amostras de concentrações maiores de 10 μM ocorreu para todas as substâncias, inclusive para a hidroquinona (ABRAMOWITZ e CHAVIN, 1980), um inibidor clássico da síntese de melanina, usado como controle positivo para inibição da tirosinase. As amostras foram testadas então na faixa de 0,1 e 10 μM e foi então possível observar o comportamento de inibição da síntese de melanina. É importante ressaltar que neste trabalho foi dosada a melanina intracelular e a que foi secretada para o meio no decorrer das 72 horas de tratamento. Nesta nova faixa de concentração apenas EAB foi testada até o momento e apresentou $K_{0,5} = 1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (Figura 15) em comparação com o controle (hidroquinona) que obteve $K_{0,5} = 0,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (Figura 16). Não houve diferença significativa entre amostra e controle conforme pode ser visto na Figura 17.

Nas últimas décadas, a procura por agentes antimelanogênicos tem aumentado em todo o mundo, não apenas para uso anticâncer como também para aplicações cosméticas (KAWANO et al., 2006). A hidroquinona, um dos mais efetivos inibidores da melanogênese *in vivo* e *in vitro*, e largamente usado em tratamentos de melanose e outras desordens de hiperpigmentação (PALUMBO et al., 1991), está proibida para uso dermatológico em alguns países como Japão e os países que

compõem a comunidade européia, por motivos de toxicidade. Neste contexto, cresce a pesquisa de novos agentes inibidores da síntese de melanina, de fontes naturais, sustentáveis e que não ofereçam riscos de toxicidade.

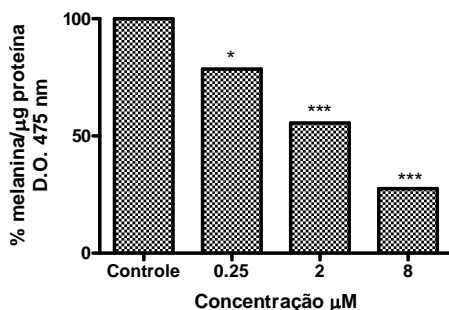


Figura 15: Avaliação da Inibição da tirosinase por EAB em células B16F10. Os valores de $*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni. Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.

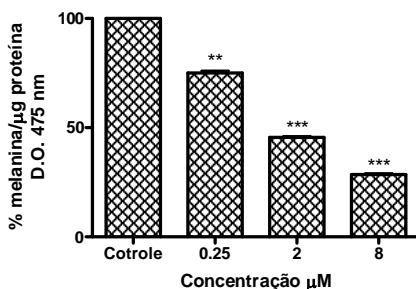


Figura 16: Avaliação da Inibição da tirosinase pela Hidroquinona (controle positivo) em células B16F10. Os valores de $*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni. Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.

Os resultados obtidos com as substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* mostram que com exceção de AP e EAP, todos os outros inibiram de maneira concentração-dependente a síntese de melanina

atuando diretamente na enzima isolada e EAB inibiu também a síntese de melanina em células produtoras de melanina (B16F10).

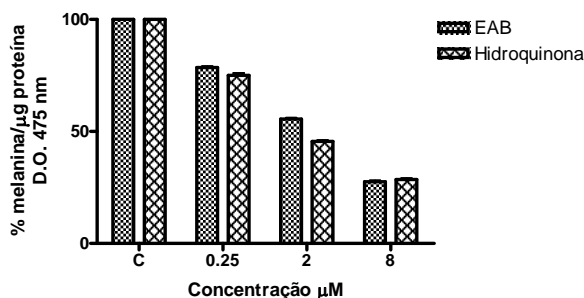


Figura 17: Avaliação da inibição da tirosinase por EAB e Hidroquinona (controle positivo). A diferença entre amostra e controle não foi significativa $p > 0,05$. Os resultados foram normalizados por micrograma de proteína.

A atividade inibitória da síntese de melanina de EAB foi maior na célula do que na enzima diretamente, $K_{0,5} = 1 \mu\text{M} \pm 0,5$ e $K_{0,5} = 8 \mu\text{M} \pm 3$, respectivamente, sugerindo que EAB diminuiu a atividade da tirosinase celular e que provavelmente há outros mecanismos envolvidos além da inibição direta da tirosinase, embora, a diferença entre as intensidades de inibição possa ser também devido a diferença na natureza da enzima. A fonte da enzima isolada é o cogumelo.

Os ácidos benzóico e parahidroxibenzóico foram avaliados por Robert e colaboradores (1997) quanto a atividade inibidora da tirosinase de palmito. Eles concluíram que ambos os ácidos exercem uma inibição competitiva da tirosinase e esta atividade parece estar ligada à presença do anel benzênico. Estas mesmas substâncias foram avaliadas neste trabalho e apresentaram atividade inibidora da tirosinase de cogumelo. Neste caso, AB apresentou atividade maior do que PHA e estes resultados são coerentes com os resultados obtidos no estudo da tirosinase de palmito.

5.3 ESTUDO PRELIMINAR DE ENCAPSULAÇÃO EM NANOPARTÍCULAS

A fração acetato (FA) apresenta características hidrofóbicas que dificultam a sua incorporação em produtos cosméticos, uma vez que solventes orgânicos não são mais aceitos pelo mercado consumidor. Outro fator limitante é a instabilidade inerente às substâncias redutoras,

frente à luz e temperatura que diminuem o tempo de validade de um produto cosmético. A encapsulação em sistemas nanoparticulados mostrou-se bastante adequada, uma vez que solucionaria estes dois problemas. Há muitos relatos na literatura de que as nanopartículas lipídicas têm sido aplicadas com bons resultados em produtos tópicos. Entre as vantagens vale destacar que estas partículas promovem uma liberação controlada da substância ativa, apresentam características oclusivas impedindo a perda de água transepidermal com consequente aumento da hidratação cutânea e por fim conferem fotoestabilidade ao ativo (MULLER et al., 2002; MANDAWGADE e PATRAVALE, 2008).

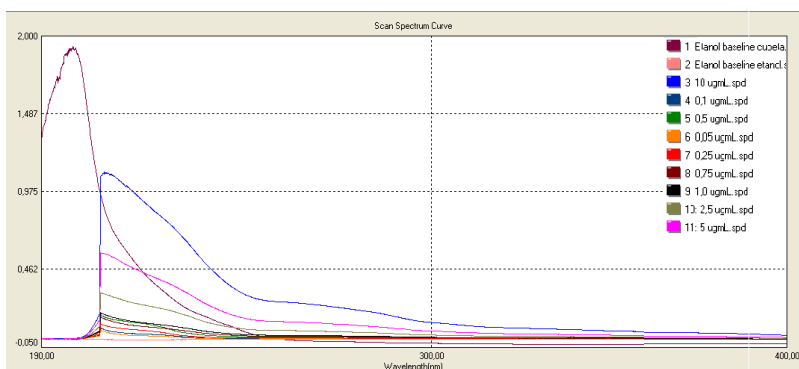


Figura 18: Espectros de absorção de FA nas concentrações entre 0 e 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

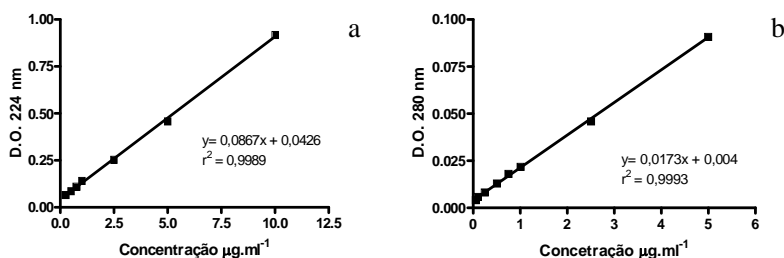


Figura 19: (a) curva de calibração da FA em 224 nm (maior absorção) e (b) 280 nm (absorção das catequinas) feitas a partir dos espectros desta fração em espectrofotômetro UV-VIS.

A fração acetato foi então incorporada em partículas poliméricas que foram denominadas de F.1 e F.2 e em partículas lipídicas denominadas de F.3, F.4 e F5.

Primeiramente a FA (na forma de pó) foi diluída em etanol nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi realizado um espectro de absorção de cada uma destas diluições em espectrofotômetro UV-VIS, na faixa de 190 a 400 nm (Figura 18). Com o objetivo de encontrar um comprimento de onda no qual houvesse uma relação linear entre a concentração da FA e a sua absorvância, foram realizadas duas curvas de calibração partindo dos referidos espectros de absorção, nos comprimentos de onda de 224 e 280 nm (Figura 19). O comprimento de onda de 224 nm encontra-se na faixa de maior absorção da FA e 280 nm é o comprimento de onda no qual as catequinas deste estudo apresentam maior absorção. Foi encontrada uma relação linear entre concentração de FA e a sua absorvância nos dois comprimentos de onda avaliados o que permitiu que a eficiência de encapsulação fosse medida por espectrofotometria e calculada pela equação da reta ($y = a.x + b$).

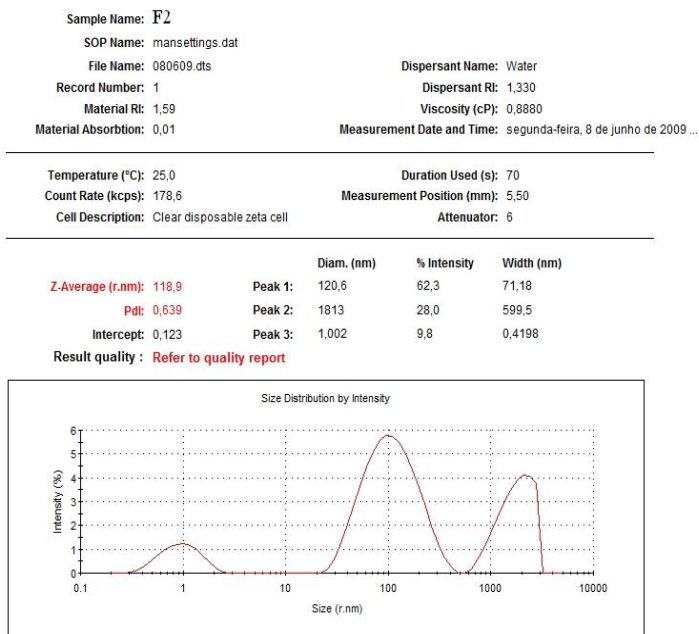


Figura 20: Relatório do equipamento Zetasizer nano ZS que demonstra o resultado da medida de potencial zeta de F2.

Ao término de cada formulação foi retirada uma alíquota da suspensão de nanopartículas, que foi filtrada por centrifugação em filtro equipado de membrana durapore com poros de 0,1µm de diâmetro (Ultrafree®-MC Millipore). O sobrenadante obtido pela filtração foi diluído em etanol e lido em espectrofotômetro a 224 e 280 nm. Como branco utilizou-se o filtrado de uma formulação de nanopartículas brancas diluído em etanol em concentração igual à da amostra em questão. Os resultados de eficiência de encapsulação bem como os dados relativos ao teor de ativo da formulação encontram-se listados na Tabela 6 onde é possível observar que as formulações F.1, F.2 e F.4 foram as que obtiveram uma maior eficiência de encapsulação. A eficiência de encapsulação foi medida em 280 nm no intuito de monitorar a presença de catequinas. O doseamento detectou a presença de substâncias capazes de absorver neste comprimento de onda e estas substâncias representaram, para a formulação F.4, 72% do total encapsulado sugerindo que as catequinas do extrato foram encapsuladas.

O diâmetro médio de partícula, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico no equipamento Zetasizer nano ZS (Malvern) a 633 nm a um ângulo de 173 °. Os resultados obtidos para estes parâmetros encontram-se descritos na Tabela 5, na qual é possível observar que as formulações de nanopartículas lipídicas (F.3, F.4 e F.5) apresentam um valor de potencial zeta que lhes confere uma maior estabilidade em relação às formulações poliméricas (F.1 e F.2).

A imagem obtida por microscopia ótica (Figura 22) de F.2 representa a população de tamanho em torno de 3626 nm observada no segundo pico do relatório do equipamento Zeta sizer nano ZS (Figura 20).

Tabela 5: Caracterização físico-química das partículas.

Formulação	Diâmetro (nm)	PDI [*]	Potencial zeta (mV)
F.1 ^(a)	211	0,22	- 12,7
F.2 ^(a)	238	0,64	-13,4
F.3 ^(b)	891	0,68	-38,5
F.4 ^(b)	193	0,30	-31,2
F.5 ^(b)	256	0,35	-30,4

^(a)Nanopartículas poliméricas; ^(b)Nanopartículas lipídicas; (*) Índice de polidispersidade.

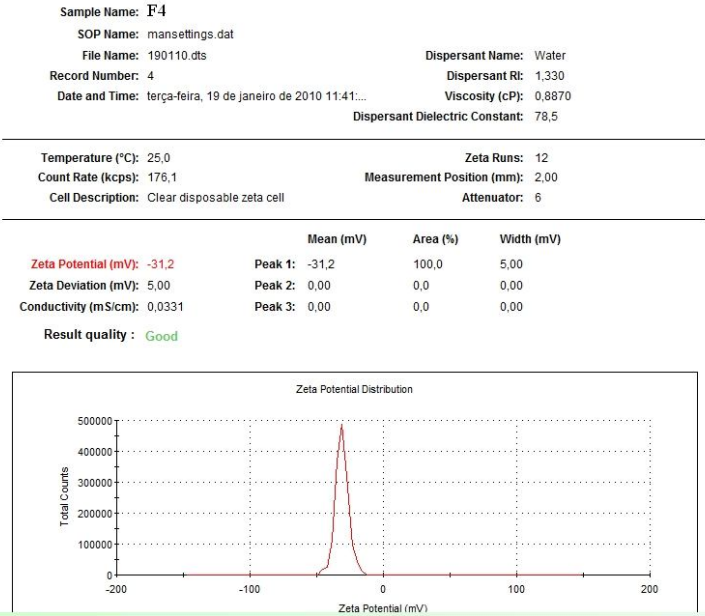


Figura 21: Relatório do equipamento zetasizer nano ZS que demonstra a estabilidade de F.4 através do resultado da medida de potencial zeta.

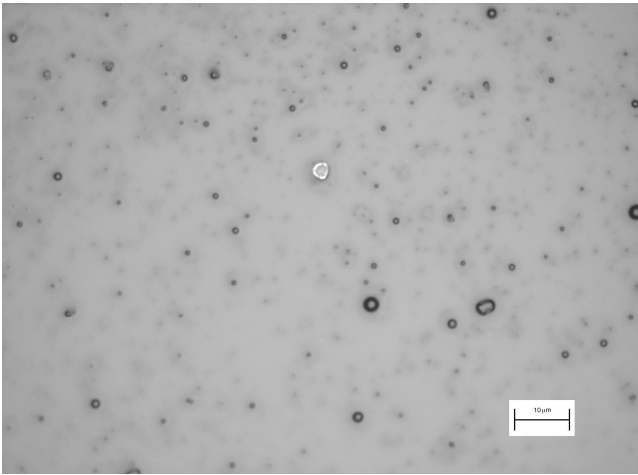


Figura 22: Imagem de microscopia ótica da formulação F2. A escala representa 10 μm.

Tabela 6: Teor de ativo e eficiência de encapsulação

Formulação	Teor de ativo (mg.ml ⁻¹)	Eficiência de encapsulação (%)
F.1 ^(a)	2,50	86
F.2 ^(a)	2,50	83
F.3 ^(b)	1,25	72
F.4 ^(b)	2,50	83
F.5 ^(b)	0,62	64

Tendo em vista os parâmetros avaliados nas Tabelas 5 e 6 a formulação F4 foi selecionada para os testes de perfil de liberação, permeação cutânea, segurança e eficácia, por apresentar uma eficiência de encapsulação alta, boa estabilidade (Figura 21), não necessitar de solvente orgânico durante o preparo e também pelas características multifuncionais que as nanopartículas lipídicas apresentam quando aplicadas sobre a pele.

6 CONCLUSÕES

Ao término deste trabalho foi possível concluir que as substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* são promissoras porque foram capazes de:

- Reduzir o radical DPPH de maneira concentração dependente e estes resultados foram coerentes com o potencial de oxidação avaliado por voltametria cíclica
- Proteger contra a lipoperoxidação induzida pela radiação UV e pelos radicais hidroxila e ascorbila de maneira concentração dependente
- A fração acetato apresentou melhores resultados em relação às substâncias isoladas, o que condiz com dados de literatura que relatam a ocorrência de uma sinergia entre os componentes do extrato no sentido de aumento de atividade
- Inibir diretamente a atividade da tirosinase isolada de maneira concentração dependente
- Inibir a síntese de melanina em células B16F10
- Não apresentar citotoxicidade significativa em células B16F10 nas concentrações em que inibiram a síntese de melanina

Desta maneira, estes resultados indicam que o extrato da casca morta da *Araucaria angustifolia* é um produto em potencial para o mercado cosmético, porque atende às exigências internacionais de respeito à natureza, ausência de testes em animais para determinação da sua segurança e eficácia, e pode ser obtido de maneira sustentável sem dano algum a planta.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade inibidora da tirosinase de todas as SEAA em células B16F10
- Avaliar a expressão da tirosinase de células B16F10 tratadas com as SEAA por Western blotting
- Incorporar as nanopartículas em uma formulação de creme
- Enviar a formulação com nanopartículas lipídicas para testá-las quanto ao perfil de liberação em modelos de pele
- Avaliar segurança e eficácia da formulação com nanopartículas lipídicas contendo a fração acetato do extrato da araucária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOWITZ, J.; CHAVIN, W. Acute effects of two melanocytolytic agents, hydroquinone and β -mercaptoethanolamine, upon tyrosinase activity and cyclic nucleotide levels in murine melanomas. **Chemico-Biological Interactions**, v. 32, p. 195-208, 1980.
- AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, p. 398-404, 2003.
- ANDRADE, D.R.J., SOUZA, R.B., SANTOS, S.A., ANDRADE, D.R. Oxygen free radicals and pulmonary disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 60-68, 2005.
- ANDRY, M.-C.; VEZIN, H.; DUMISTRACEL, I.; BERNIER, J.L.; LÉVI, M.-C. Proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties and free radical scavenging activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 171, p. 217-226, 1998.
- BERTLING, C, LIN F, GIROTTI A. Role of hydrogen peroxide in the cytotoxic effects of UVA/B radiation on mammalian cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, p. 137142, 1996.
- BIRD, R.P.; DRAPPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105; p. 295-305, 1984.
- BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 811-826, 2004.
- BOMBARDELLI, E.; SPETTA, M. Phospholipid-polyphenol complexes: A new concept in skin care ingredients. **Cosmetics & Toiletries**, v. 106 p. 69-76, 1991.
- BORGIA, S.L., REGEHLY, M., SIVARAMAKRISHNAN, R., MEHNERT, W., KORTING, H.C., DANKER, K., RODER, B., KRAMER, K.D., SCHAFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles

for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paelectric spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 151–163, 2005.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, p. 137–149, 1996.

CASTELI, F.; TROMBETA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipamitoyl phosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **Journal of Pharmacological Toxicological Methods**, v. 37, p. 135–141, 1997.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, p. 1161–1168, 2002.

CORDENUSI, B.R., MENEZES, E.W., GENOVESE, M.I., COLLI, C., SOUZA, A.G., LAJOLO, F.M. Chemical composition and glycemic index of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3412–3416, 2004.

COSIO, M.S.; BURATTI, S.; MANNINO, S.; BENEDETTI, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. **Food Chemistry**, v. 97, p. 725–731, 2006.

COURDEROT-MASUYER, C., LAHET, J.J., VERGES, B., BRUN, J.M., ROCHETTE, L. Ascorbyl free radical release in diabetic patients. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 46, p. 1397–1401, 2000.

DAVIES, K.J.A. Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects. Oxford: Pergamon, 1991.

DE LIMA, V. R.; MORFIM, M. P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membrane and antioxidants. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 132, p. 197-208, 2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONSECA, F.N., FERREIRA, A.J.S., SARTORELLI, P., LOPES, N.P., FLOH, E.I.S., HANDRO, W., KATO, M.J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 575-580, 2000.

FRAGA, C.G.; MARTINO, V.S.; FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D.; BOVERISA, A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 717-720, 1987.

GALLEANO, M., AIMO, L., PUNTARULO, S. Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. **Toxicology Letters**, v. 133, p. 193-201, 2002.

GILCHREST, B.A.; VRABEL, M.A.; FLYNN E.; SZABO, G. Selective cultivation of human melanocytes from newborn and adult epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, p. 370-376, 1984.

HADSHIEW, I.M.; ELLER, M.S.; GILCHREST, B.A. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 11, p. 19-25, 2000.

HALABAN, R.; LANGDON, R.; BIRCHALL, N.; CUONO, C.; BAIRD, A.; SCOTT, G.; MOELLMANN, G.; MCGUIRE, J. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 107, p. 1611-1619, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1984.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. How to characterise a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, p. 1-32, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2000.

HAMMERSTONE, J.F., LAZARUS, S.A., SCHMITZ, H.H., Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods, **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2086S-2092S, 2000.

HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A., Advances in flavonoid research since 1992, **Phytochemistry**, v. 55, p. 481–504, 2000.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonóides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; JANOFF, A. S.; CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipids vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 40, p. 89-107, 1986.

HUBEL, C.A.; KAGAN, V.E.; KOSIN, E.R.; McLAUGHLIN, M.; ROBERTS, J.M. Increased ascorbate radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, p. 1-4, 1997.

IMOKAWA, G.; YADA, Y.; MIYAGISHI. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 24675-24680, 1992.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H.; Chemical analysis of melanins and its application to the regulation of melanogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, p.103-109, 2000.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p.801-810, 2002.

JURKIEWICZ, B.; BUETTNER, G. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, p. 1-4, 1994.

KAUR, I.P.; KAPILA, M.; AGRAWAL R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, v. 6 p. 271-288, 2007.

KAWANO, M.; MATSUYAMA, K.; MIYAMAE, Y.; SHINMOTO, H.; KCHOUK, M.E.; MORIO, T; SHIGEMORI, H.; ISODA, H. Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. **Experimental Dermatology**, v.16, p. 977-984, 2007.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 1, p. 21-48, 1993.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KLIGMAN, L.; KLIGMAN, A. The nature of photoageing: its prevention and repair. **Photodermatology**, v. 3, p. 215-227, 1986.

KOPPENOL, W. H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Letters**, v. 264, p. 165-167, 1990.

LLOYD, R.V.; HANNA, P.M.; MASON, R.P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the fenton reaction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 885-888, 1997.

MANDAL, T.K.; CHATTERJEE, S.N. Ultraviolet- and sunlight-induced lipid peroxidation in liposomal membrane. **Radiation research**, v. 83, p. 290-302, 1980.

MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 132-138, 2008.

MANNINO, S., BRENNNA, O., BURATTI, S., COSIO, M.S. A new method for the evaluation of the 'antioxidant power' of wines. **Electroanalysis**, v. 10, p. 908-912, 1998.

MAURICIO, A.Q., LOPES, G.K., GOMES, C.S., OLIVEIRA, R.G., ALONSO, A., HERMES-LIMA, M. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1620, p. 15-24, 2003.

MENDITTO, A., PIETRAFORTE, D., MINETTI, M. Ascorbic acid in human seminal plasma is protected from iron-mediated oxidation, but is potentially exposed to copper-induced damage. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1699-1705, 1997.

MENSON, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MOMTAZ, S; MAPUNYA, B.M.; HOUGHTON, P.J.; EDGERLY, C.; HUSSEIN, A.; NAIDOO, S.; LALL, N. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L.

stem bark, used in South Africa for skin lightening. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p. 507–512, (2008)

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, R.H., RADTKE, M., WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

NERYA, O.; MUSA, R.; KHATIB, S.; TAMIR, S.; VAYA, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1389-1395, 2004.

NO, J.K.; SOUNG, D.Y.; KIM, Y.J.; SHIM, K.H.; JUN, Y.S.; RHEE, S.H.; YOKOZAWA, T.; CHUNG, H.Y. Inhibition of tyrosinase by green tea components. **Life Sciences**, v. 65, p. 241-246, 1999.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OKADA, K; TAKAHASHI, Y; OHNISHI, K; ISHIKAWA, O; MIYACHI, Y. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 8, p. 183-186, 1994.

OZEKI, H; ITO, S; WAKAMATSU, K; ISHIGURO, I. Chemical characterization of pheomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 539–548, 1997.

PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M.; MISURACA, G.; PROTA, G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1073, p. 85-90, 1991.

PASSERON T.; BALLOTTI, R; ORTONNE, J.-P. Melanogenesis. **EMC-Dermatologie Cosmétologie**, v. 2, p. 204–216, 2005.

PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 299–312, 2005.

REINLI, K., BLOCK, G., Phytoestrogen content of foods: a compendium of literature values, **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 123-148, 1996.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, v. 56, p. 359-384, 1998.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBERT, C.; ROUCH, C.; CADET, F. Inhibition of palmito (Acanthophoenix rubra) polyphenol oxidase by carboxylic acids * **Food Chemistry**, v 59, p. 355-360, 1997.

RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; SORRENTI, A.; GIACOMO, C. D.; VIRGATA, G.; BARCELLONA, M.L.; VANELLA, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, p. 91-98, 2000.

SAIJA, A.; SCALESE, M; LANZA, M; MARZULLO, D; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their Interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 481-486, 1995.

SANZ, M.J.; FERRANDIZ, M.L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M.C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v.24, p.589-99, 1994.

SANZ, M.J.; FERRANDIZ, M.L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M.C.; GIL, B.; BUSTUS, G.; UBEDA, A. GUNASEGARAN, R.;

ALCARAZ, M.J. Influence of a series of natural flavonóides on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v. 24, p. 589-599, 1994.

SCHENKMAN, J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 83-89, 1978.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. *In*: Sies, H. (Org.). **Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants**. Academic Press: San Diego, p. XV–XXII, 1991.

SOLANO, F.; BRIGANTI, S.; PICARDO, M; GHANEM, G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Research**, v. 19, p. 550-571, 2006.

SUTTON, H. C.; WINTERBOURN, C. C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, p. 53-60, 1989.

TEIXEIRA, A.; MORFIM, M. P.; CORDOVA, C. A. S. de; CHARÃO, C. C. T.; LIMA, V. R. de; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbys radicals and by peroxinitrite. **Journal of Pineal Research**, v. 35, p. 1-7, 2003.

VENKATESWARLU, V.; MANJUNATH, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 627– 638, 2004.

VIVOT, E.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, M.C.; CRUANES, M.J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G.S.; MARTINEZ, E.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of Inga verna subsp.

affinis. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.65–71, 2001.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, v. 33, p. 4449-4453, 1994.

WATTS, P. J., DAVIES, M. C. and MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, p. 235-259, 1990.

WILSCHUT, J.; HOEKSTRA, D. Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 40, p. 145-166, 1986.

WISSING, S.A; KAYSER, O.; MULLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

XU, Y.; FISHER G.J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science**, Supplement 1, p. S1-S8, 2005

YAMAGUCHI, L.F., MASCIU, P., KATO, M.J., VASSAO, D.G. Biflavones from leaves of Brazilian coniferae *Araucaria angustifolia* protects against lipoperoxidation and DNA single-strand breaks. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 563-567, 2002.

YAMAGUCHI, L.F., VASSAO, D.G., KATO, M.J., DI MASCIU, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247, 2005.

YEAGLE, P. L. **The Membrane of Cells**. California: Academic Press, 1993.

YIN, J.J., SMITH, M.J., EPPLEY, R.M., PAGE, S.M., SPHON, J.A. Effects of fumosin B1 on lipid peroxidation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1371, p. 134-142, 1998.

ZANDAVALLI, R.B., DILLENBURG, L.R.; SOUZA, P.V.D.
Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to
inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied
Soil Ecology**, v. 25, p. 245-255, 2004.

ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO

Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead-bark.

Andrea Seccon¹, Daniela W. Rosa¹, Rilton A. Freitas², Maique W. Biavatti^{1*}, Tania B. Crezynski-Pasa¹.

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC - Brazil

² UNIVALI, CCS, Itajaí, SC - Brazil

Abstract

This work presents the antioxidant activity of extract, fraction and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead-bark. This tree characterizes the Mixed Ombrophile Forest, which is endangered due the extensive loggings. The dead-bark of Araucária is naturally discarded by the trees and its hidroalcolic crude extract has shown protective potential against the stress induced by H₂O₂ in cell culture. Several *in vitro* models were used to access the antioxidant potential of the crude, a hidroalcolic fraction and some isolated compounds. Two isolated catechins derivatives were described at the first time as natural products. Both, the extracts and isolated compounds particularly the compound 5 showed very high antioxidant activity. For DPPH assay the compound 5 showed an IC₅₀ of 0.7 µM and for lipid peroxidation assay 21 µM and 35 µM when induced by UV and •Asc, respectively, results comparable to those of quercetin whose antioxidant properties are very well characterized.

Keywords

Araucaria angustifolia, antioxidant, phenolics, epiafzelechin *p*-hydroxybenzoate; (-)-epiafzelechin protocatchuate, bark.

* Correspondence:

Maique Weber Biavatti, UFSC/CCS/CIF, Campus Universitário Trindade - 88040-900 – Florianópolis –SC, Brazil, Telephone/Fax:+ 55 48 3721 5075/9542; maique@ccs.ufsc.br

1. Introduction

The phenolic compounds in the outer layers of plants such as peel, shell, bark and hull are present in high concentration to protect inner materials such as the cotyledon and support the utilization of agricultural by-products as source of natural antioxidants (Francisco and Resurrecion, 2009).

The endemic tree *Araucaria angustifolia* (Brazilian Pine) characterizes the Mixed Ombrophile Forest, one of the phytophysiognomies of the Atlantic Forest biome. Its timber was widely explored due to its high quality, and since 1992, this species is described as an endangered species. The Atlantic Forest law, which defines the rules and principles for its use and protection, incentivates the sustainable exploitation of plants as an strategy to stimulate the recovery of the forest remanescents. The dead-bark of *Araucária* is naturally discarded by the trees and can be collected without danifying them during the whole year; its hidroalcoolic crude extract is rich in polyphenolic compounds.

The search for minimizing the oxidative damage caused by free radicals from UV radiation and pollution in the skin includes the topical use of vitamins and phenolic antioxidants, enriching the endogenous skin system protection (Röpke et al., 2002). Several cosmetic products in the market contain green tea, red tea, vine or grape extracts, used to prevent skin cancer and aging.

The dead-bark of *A. angustifolia* is investigated for the first time in this study, but previous studies verified the antioxidant potential of leaf extracts (Yamaguchi et al., 2002 e 2005). From the leaves were isolated biflavonoids (Yamaguchi et al., 2002 and 2009) and isoflavones (Fonseca et al., 2000), lignans and nor-lignans from the resin (Ohashi et al., 1992; Fonseca et al., 1979) and diterpenes (Campello e Fonseca, 1975). The isolated amentoflavone-type biflavonoids (C8''-C3') have demonstrated high antioxidant capacity and high capacity of quenching singlet oxygen as well as inhibit the oxidation of DNA and the lipoperoxidation promoted by free radicals (Yamaguchi et al., 2005).

In this work, the dead-bark of the endangered species *Araucaria angustifolia* was extracted with ethanol-water (1:1), partitioned with ethyl acetate and the acetate fraction (AF) was characterized, resulting in the isolation of several phenolic compounds, identified by spectroscopic techniques. These materials were evaluated for their

antioxidant activity particularly the reactivity with DPPH and protection toward lipid peroxidation induced by different reactive oxygen specie (ROS). Also, the redox potential of each fraction and compound was determined.

2. Methods

2.1 Plant material, extraction and isolation

The dead-bark of *Araucaria angustifolia* was collected in an experimental farm in General Carneiro (PR), containing 17.68% of umidity and after natural dryness presented 12.77%. The crushed material (5-2 mm) was percolated (1:2) with ethanol-water (50% at 70 °C), then centrifugated to give the hydroalcooholic liquid extract with 5.25% of dry residue, that was concentrated to furnish 10% of dry residue. The concentrated crude hydroalcooholic extract (HE) was partitioned with ethyl acetate, furnishing the acetate fraction (AF), that was subjected to column chromatography (CC) using silica gel and a gradient of dichloromethane-methanol (95:5 to 5:95) as eluent, to furnish the following compounds: benzoic acid (**1**), *p*-hydroxybenzoic acid (**2**), protocatechuic acid (**3**) and quercetin (**4**). Further CC with the same system was employed with the impure fractions above to isolate two catechins: (-)-*epiafzelechin* protocatechuate (**5**) and (-)-*epiafzelechin p*-hydroxybenzoate (**6**). The latest fractions of the previous separation procedure were subjected to CC using cellulose and etanol as eluent and furnished (-)-*epicatechin* (**7**). The structures of the isolated compounds **1-4** and **7** were identified by nuclear magnetic resonance analyses comparing to previously published data (Spectra Database SDBS for **1-3**, Sing and Chauhan (2009) for compound **4** and Foo et al. (1996) for compound **7**). The spectroscopic data of the compounds **5** and **6** are as follows:

(-)-(2R, 3R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-3-yl 3,4-dihydroxybenzoate, *epiafzelechin* protocatechuate (**5**)

Red gum, $[\alpha]_D = -36$ ($c = 0.35$, EtOH); ^1H NMR (acetone- d_6 , 400 MHz): δ 7.53 (*d*, $J = 1.9$ Hz, H2''), 7.47 (*dd*, $J = 8.2$ and 1.9 Hz, H6'), 7.36 (*d*, $J = 8.6$ Hz, H2', H6'), 6.90 (*d*, $J = 8.2$ Hz, H5''), 6.81 (*d*, $J = 8.6$ Hz, H3', H5'), 6.03 (*d*, $J = 2.4$ Hz, H8), 5.93 (*d*, $J = 2.4$ Hz, H6), 4.90 (*bs*, H2), 4.17 (*bs*, H3), 2.88 (A of AB q , $J = 16.3$, 4.3, H4a), 2.74 (B of AB q , $J = 16.8$, 2.5, H4b); ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 100 MHz): δ 167.7 (CO), 160.1 (C4'), 157.6 (C5, C7), 157.2 (C9), 150.7 (C3''), 145.5 (C4''), 131.4

(C1'), 129.1 (C2', C6'), 123.6 (C2''), 123.1 (C1''), 117.5 (C6''), 115.7 (C3', C5'), 115.5 (C5''), 96.1 (C10), 95.7 (C6, C8), 79.5 (C2), 66.8 (C3), 29.4 (C4); ESI-MS m/z 409.1 $[M - H]^-$; ESI-MS/MS (daughter ions, 35%) m/z 365 $[M - CO_2]^-$ (10), 325 (83), 289 (100), 283, 273, 245, 205, 203, 152, 109 (Found C, 65.59; H, 4.05. Calcd for $C_{22}H_{18}O_8$: C, 64.39; H, 4.39 %)

(-)-(2R, 3R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-3-yl 4-hydroxybenzoate, epiafzelechin p-hydroxybenzoate (**6**)

Red gum, $[\alpha]_D = -56$ ($c = 0.39$, EtOH); 1H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.85 (d , $J = 8.7$ Hz, H2'', H6''), 7.31 (d , $J = 8.3$ Hz, H2', H6'), 6.86 (d , $J = 8.6$ Hz, H3'', H5''), 6.75 (d , $J = 8.6$ Hz, H3', H5'), 5.99 (d , $J = 2.3$ Hz, H8), 5.88 (d , $J = 2.3$ Hz, H6), 4.88 (bs , H2), 4.17 (bs , H3), 2.86 (A of ABq, $J = 16.6$, 4.5, H4a), 2.74 (B of ABq, $J = 16.8$, 2.5, H4b); ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 100 MHz): δ 162.5 (CO), 157.6 (C5, C7, C9), 157.2 (C4'), 132.7 (C4''), 131.5 (C1'), 129.1 (C2', C6', C2'', C6''), 122.9 (C1''), 115.9 (C3', C5'), 115.5 (C3'', C5''), 99.7 (C10), 96.2 (C6), 95.7 (C8), 79.5 (C2), 66.8 (C3), 29.4 (C4); ESI-MS m/z 393.3 $[M - H]^-$; $C_{22}H_{18}O_7$: m/z 301 (80), 285 (60), 137 (100). Data in accordance with WO/2006/017981.

2.2 Spectrophotometric determination of phenolic compounds

The total phenolic content of dead-bark *A. angustifolia* extract was determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999). Total phenolics were expressed as mg gallic acid equivalent per gram of extract or acetate fraction (AF). The total anthocyanins content was determined using the pH differential method described in Lapornik et al. (2005) expressed as mg malvidin glucoside equivalent per gram of extract or fraction acetate; total proanthocyanidins (condensed tannins) were determined using the vanillin assay (Sun et al., 1998). The total amount of procyanidins was expressed as procyanidin B2 equivalents per gram of extract or acetate fraction. All samples were analysed in triplicate.

2.3 LC analysis

The HE was analysed in a LC system consisted of a Waters 600 pump (Milford, Massachusetts, USA) and 2996 PDA detector, an automatic 717 plus injector, in line degasser AF and Millennium Empower software. The injections (20 μ l) were carried out on a

Phenomenex (Torrance, California, USA) Synergi Fusion RP 80Å (250 x 4.6 mm). The mobile phase consisted of a linear gradient from 10 to 50% of ultrapure water acidified with H_3PO_4 0.01% in 25 min, plus 5 min to reequilibrate the column back to its initial condition. The flow rate was of 0.8 ml/min. The analysis was monitored at 280 nm and the column oven fit to 35 °C. All solvents were LC grade (Tedia, Fairfield, Ohio, USA) and were degassed by ultrasonic bath (Unique, Santo Amaro, São Paulo, Brazil). The water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). All solutions were filtered through 0.45 µm membranes (Schleicher & Schuell, Maidstone, Kent, UK). Samples were analysed in triplicate, diluted 1:10 with the mobile phase.

2.4 Oxidative Stress in mouse L929 fibroblasts Assay

In order to verify the cytotoxicity/protection profile of the HE, confluent L929 fibroblasts (BCRJ) were used, propagated and maintained with Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM, glutamine 2mM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and PSN (0.05 mg/ml penicillin, 0.05 mg/ml streptomycin and 0.010 mg/ml gentamicin), at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. L929 fibroblasts (1×10^4 cell/ml, 100µl per well) were seeded in a 96-well plate and 24h after plating they were treated with successively sample dilutions (100µL per well, from 0.01 to 1000 µg/ml), in triplicate. Twenty four hours later, medium (with and without samples) was removed and oxidative stress was induced by exposure fibroblast to H_2O_2 at different concentrations (from 0.5 to 100 µM in DMEM/FBS 5%, 100µl per well) during 90 minutes. Cells were allowed to recover in fresh medium for 48h after stress before MTT assay to access cell. Cell controls with or without H_2O_2 were used and acetyl cystein was used as a positive antioxidant control. The results obtained with the cell line were expressed as mean \pm SEM and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). When significant values were found ($p < 0.05$), post hoc comparisons of means were made using Duncan test.

2.5 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay

The radical-scavenging activity of the extracts was measured by a method slightly modified from that reported by Vivot et al. 2001. The assay involves the incubation of the reaction medium for 5 min at 25 °C

in an ethanolic solution of 20 μM DPPH, and the measurement of the optical density at 517 nm (Spectro Vision UV/VIS, Chine). The antioxidant activities of the HE and AF were expressed as IC_{50} calculated from the Hill Plot (Graphpad Prisma 4), which was defined as the concentration of the extract or compound required to reduce 50 % of the DPPH free radicals.

2.6 Determination of the redox potential of the compounds

The cyclic voltametry assays were performed with a potentiostat Autolab PGSTAT30 potentiostat/galvanostat (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands) coupled to a computer with GPES 4.9 software. The rate scan was of 100 mV.s^{-1} , in a phosphate buffer solution (0,1M; pH 6). The samples were tested immediately after the preparation in a concentration of 30 $\mu\text{g/ml}$ of hydroalcoholic extract (HE) or acetate fraction (AF) and of 30 μM for isolated compounds. The measurements were performed using a system of three electrodes being the work electrode of carbon paste, the auxiliary electrode of platina and the reference electrode of Ag/AgCl. The quercetin was used as a positive control at the same concentration range of the tested samples.

2.7 Lipoperoxidation induced by UV light

The effect of the compounds against the lipid peroxidation (LPO) induced by UV radiation was evaluated on soy bean phosphatidylcholine (PC) liposomes and in rat microsomes. The PC liposomes were prepared by the method of lipid film hydration. The reaction medium containing the liposomes (25 mg/ml), with or without the samples was exposed for 60 min to UV radiation from a germicidal lamp ($\lambda = 254 \text{ nm}$) positioned 10 cm from the samples (Mandal and Chatterjee, 1980). The extent of LPO was determined by TBARS method (Bird and Draper, 1984). Microsomes were prepared from rat liver by differential centrifugation with calcium aggregation (Schenkman and Cinti, 1978). The fractions obtained were stored in a freezer at -84°C . The protein concentration was determined according to the Lowry method.

The results were expressed in percentage considering the control as 100% of peroxidation (Spectro Vision UV/VIS, Chine). The IC_{50} was calculated by the Hill Plot (Graphpad Prisma 4).

2.8 Lipoperoxidation induced by ascorbyl radical

Lipid peroxidation was induced by the reaction system Fe/ascorbate which forms the $\text{Asc}^{\bullet-}$ (Teixeira et al., 2003). To the reaction medium containing 25 mg/ml liposomes in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, FeSO_4 (25 μM) and ascorbate (500 μM) were added. The samples were incubated for 30 min at 37°C. Incubations were performed with and without (control) different concentrations of the compounds. The extent of lipid peroxidation was determined by the TBARS method (Bird and Draper, 1984). The results were expressed in percentage considering the control as 100% of peroxidation. The IC_{50} was calculated by the Hill Plot (Graphpad Prism 4).

2.9 Lipoperoxidation induced by hydroxyl radical

The hydroxyl radical was produced by Fenton reaction system $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}/\text{Ascorbate}$, adapted from Halliwell et al., 1987. PC Soy bean liposomes (25 mg/ml) were added to the reaction medium containing 20 μM FeCl_3 , 2,8 mM H_2O_2 and 100 μM of the ascorbic acid. The samples were incubated for 30 min at 37°C. Incubations were performed with and without (control) different concentrations of the compounds. The extent of LPO was determined by the TBARS method (Bird; Draper, 1984). The results were expressed in percentage considering the control as 100% of peroxidation. The IC_{50} was calculated by Hill Plot (Graphpad Prism 4).

3. Results

The spectrophotometric analysis of total phenolic content found a mean value of 64 and 33 mg/g of gallic acid equivalent for the HE and AF respectively. For total anthocyanin content was found 1.85 and 3.6 mg/g of malvidin glucoside equivalent and for total proanthocyanidin 12 and 5 mg/g of procyanidin B2 equivalent for the HE and AF respectively.

The chromatographic profile of the HE presented high concentration of flavanols in the phenolic composition of the extract (Figure 2, table 1). It is possible to note the presence of polymeric proanthocyanidins (peak 3 of Figure 2).

The isolated compounds **1-4** are widely found in plants, very oxidized and probable products of degradation of the catechins **5** and **6** that are here for the first time described as natural products. Compound

5 is new, and compound **6** was previously synthesized and tested as proteasome inhibitor (Landis-Piowar et al., 2005).

In order to look for some sign of cytotoxicity in the HE it was incubated alone with L929 cells, showing any evidence of cytotoxicity by optical microscopy or by MTT viability test. This verification of cell viability was the first important step to determine the concentration of the hydrogen peroxide (H_2O_2) for the oxidative stress test. Hydrogen peroxide is one of the most common reactive oxygen species generated *in vivo* and is involved in immunological response or programmed cell death. Further, H_2O_2 has been implicated as a mediator of cell injury e.g., atherosclerosis, inflammation or ischemia, as well as in the toxicity of various exogenous agents and chemotherapeutic drugs (Halliwell and Cross 1994).

The IC_{50} of H_2O_2 alone for L929 cells was of $0.125 \mu\text{M}$ (r 0.98, $p < 0.0001$). The pre-incubation of L929 cells with $1 \mu\text{g/ml}$ of HE increased the IC_{50} to $0.44 \mu\text{M}$ (r 0.92, $p < 0.01$) suggesting an increase in cell protection against oxidative stress generated by H_2O_2 . Increasing the HE concentration in 1000 times (1 mg/ml), the degree of cellular protection was increased 131%, suggesting dose-response effect. For the control acetyl cysteine only in high concentrations (1 mg/ml or 6 mM) the cell protection was observed. At lower concentration (from 0.006 to 0.6 mM), no antioxidant activity was observed. Similar results for acetyl cysteine were observed by Lomonosova, Kirsch and Groot (1998).

The DPPH assay evaluates the ability of molecules with antioxidant properties to scavenge free radicals. DPPH is a free radical, stable at room temperature and violet in color. When it is reduced in the presence of an antioxidant molecule, it results discolored proportionally to the number of electrons captured.

The results presented in the Table 2 show that all substances tested including the crude extract (HE) and AF have antioxidant potential and indicates the catechine **6** as the most potent in preventing the oxidation of DPPH, followed by AF and HE. The isolated compounds presented antioxidant activity in the follow order **4** > **5** > AF > **3** = HE > **2** > **6** > **1**.

The reactivity with DPPH is in accordance with the redox potencial of the compounds obtained by electrochemical assay. The ideal conditions for the electrochemical assays were obtained from the previous screening of pH buffer solution, rate scanning, and sample concentration. The follow parameters were optimized after screening of

conditions for buffer solution, rate scanning, HE and AF concentrations, including the system of electrodes (see item 2.6 of Methods section).

The substances were also evaluated as protectors of lipid peroxidation of the PC (phosphatidylcholine) liposomes induced by UV light. The assay was carried out for each substance with increasing concentrations. After the membranes exposure to UV light, a significant increase in TBARS formation was observed. The addition of the substances in a concentration-dependent manner reduced the TBARS production. Two controls were run in parallel: i) without the oxidation source; ii) without the sample, to evaluate the basal peroxidation of the liposomes. The assays were done in triplicate, three times. The Table 3 presents the IC₅₀ for each substance, showing that all substances tested including the HE and AF were able to prevent the lipid peroxidation induced by UV light with relatively low concentration and again the catechine **6** was the most potent among the isolated compounds.

The lipoperoxidation was also tested using liver microsomes as the ROS target. Two different sources of membrane aggressor were used: the UV light and ascorbyl radical. However the assays were done only with catechine **5**, since it showed better result with liposomes. The compound was also able to protect the membranes of the microsomes from the attack of ROS in relatively low concentration, showing an IC₅₀ of $6 \pm 0.25 \mu\text{M}$ and $18 \pm 4 \mu\text{M}$ over the ascorbyl radical and UV radiation respectively.

4. Discussion

In general, high phenol content is significantly correlated with high antioxidant ability (Hodzic et al., 2009). Catechins and proanthocyanidins are phenolics that protect the inespecific biological oxidation, with comproved activity in the tumor prevention (Nandakumar et al., 2008), photoprotection (Rabe et al., 2006). Green tea catechins have been widely studied, demonstrating, among others, stabilizer effect of the collagen, and diminishing the histamine liberation (antialergic effect) (Kondo et al., 2006). Compounds **5** and **6** are esterified derivatives of *epiafzelechin* (*cis* 3,4',5,7,-tetrahydroxyflavan), that is isolated from other fonts and presented antimicrobial (Kuetze et al., 2008), cyclooxygenase-1 inhibitor and anti-inflammatory effects (Min et al., 1999). Oligomers of *epiafzelechin* exhibited various modes of action in suppressing Herpes Simplex Virus multiplication (Cheng et al., 2006) and polymers of *epiafzelechin* exhibited inhibitory effects on HIV-1 protease (Ma et al., 2000).

Starting with the absence of cytotoxicity of HE from *Araucaria angustifolia* dead-bark together with its protective potential against the oxidative stress induced by H_2O_2 , several phenolic classes were detected by spectrophotometric methods and LC analysis. The antioxidant activity of its ethyl acetate fraction (AF) and resulted isolated compounds were evaluated by different methods. The scavenger activity was initially assayed by the DPPH method. Although all samples showed high reactivity with the free radical (concentration dependent) the samples HE and AF were the most potent. The higher scavenger activity may be in consequence of a synergy between several substances (phytochemicals) present in the extracts and in the fraction including phenolic compounds, aminoacids, pigments among others (Choi et al., 2002).

The number of DPPH molecules that are reduced seems to be correlated with the number of available phenolic hydroxyl groups in the antioxidant compounds, and also depends on its structural configuration and conformation (Brand-Williams et al., 2005).

According to Saija et al. (1995) the logP and some structural features are determinant for the scavenger activity or antioxidant potential of flavonoids: i) the *o*-dihydroxy (catechol) from the B ring; ii) the double bond 2-3 in conjugation with the function 4-oxo; and iii) the presence of the hydroxyl groups at the positions 3, 5 and 7. The quercetin (**4**) shows these three requisites, while compounds **5** and **6** present only one hydroxyl at position 4' of the B ring; and the hydroxyl of the position 3 suffered esterification with the 3,4-dihydroxybenzoic acid in the compound **5**, which is probably the responsible for its higher antioxidant activity, since compound **6** presents the position 3 sterified with the *p*-hydroxybenzoic acid (**5** > AF > **3** = HE > **2** > **6** > **1**).

Taking into account that the electrochemical behavior of the evaluated substances depends on the structural characteristics as the number and position of the phenolic hydroxyls, cyclic voltametry assays were performed. The voltamograms obtained for the majority of compounds are in accordance with the results from the DPPH assay (Table 2). The oxidation potential of the substances give an estimative of the necessary energy to donate one electron and, therefore the lower the oxidation potential of a substance, the easier it will donate an electron and the higher is the expected antioxidant activity (Mannino et al., 1998). Considering that quercetin (**4**), used as a positive control for these assays, presented an oxidation peak at 229 mV and the catechin **5** showed the oxidation peak at 284 mV, while **6** at 339 mV, and **3** at 532 mV, this indicate that the number of hydroxyls substituents could be

responsible for these peaks. These features do not correlate directly with the scavenger potential of the compounds, maybe the logP properties of the compounds could play also a role, discussed ahead.

The *p*-hydroxybenzoic acid (**2**) was not able to donate hydrogens to free radicals generated in aqueous phase, due to the ionization potential of the carboxyl group which affects the phenol ring at positions *ortho* and *para*. Dihydroxybenzoic acid derivatives show antioxidant activity which is related with the positions of the hydroxyls at the ring. The 3,4-dihydroxy benzoic that has hydroxyls at position *meta* and *para* shows higher antioxidant activity than the 2,3-dihydroxy benzoic acid (Rice-Evans et al., 1996). It seems that the proximity of the *ortho* phenolic substituents affects the availability of the hydrogens since the hydrogens at *meta* position are more effective for such activity.

Evaluating the results presented in the Table 2, compounds **6-2** and **5-3** have a similar antioxidant profile observed in both DPPH and cyclic voltametry, which allows to suggest that the *meta* phenolic hydroxyl have a key role for a good activity of the compounds.

Lipid peroxidation consists of the oxidation mediated by ROS, the polyunsaturated fatty acids present in cell membranes and in lipoproteins. There is a relationship between lipid composition and physical state of cell membranes and the conformation and activity of enzymes and receptors. The lipids that constitute the membranes can be chemically modified by reactive species, resulting in alteration of its functions and features. The liposomes, because they have similar characteristics to biological membranes, but controllable, are accepted as a model membrane to study the in vitro peroxidation (Teixeira et al., 2003).

All substances were also evaluated in relation to its protection capability toward the lipid peroxidation of liposomes bilayers. In this case the lipid peroxidation was induced by UV light and by hydroxyl and ascorbyl free radicals. The exposition to UV light induced the production of ROS and an oxidative stress is established (Okada, et al., 1994). Among the ROS, the hydroxyl radical produced by the Fenton reaction is extremely reactive and the ascorbyl radical in its turn is also generated through the Fenton reaction with the participation of Fe (III) or Cu²⁺ (Halliwell and Gutteridge, 1999). The ascorbyl radical presents a longer half life-time compared with the most ROS and is used as an oxidative stress biomarker in the plasma through the relation of ascorbyl/ascorbate (Puntarulo, 2005 and references there in).

Therefore, the lipid peroxidation was monitored by the TBARS method and the substances were screened toward three lipoperoxidation

inducer. Most substances showed protection against lipid peroxidation induced by UV light and by the free radicals evaluated in this work. The concentration used in court trials was of 50 µg/ml for HE and AF and of 50 µM for the isolated compounds, thus, HE and FA, and the compound 5 were more effective than the others isolated compounds (Table 3)

Besides of the structural features that warrant to the flavonoid free radical scavenging activity, the flavonoids also act as an ancor, through their chemical bonds to the polar head of phospholipids forming a physical-chemical reversible complex. It was suggested that, depending on their solubility, there is a relationship between flavonoid interaction with model membrane and a formation of complex flavonoid-phospholipid (Saija et al., 1995).

Thus, all substances were evaluated for its ability to protect the lipid bilayer liposomal lipid peroxidation induced by UV radiation. After one hour of exposure to UV light, there was a significant increase in lipid peroxidation. Additionally, all substances promoted a protection of the liposomal membrane in a concentration-dependent way, because increasing their concentration the TBARS amount was reduced, although, HE and FA, and the compound 5 were also more effective than the others isolated compounds.

There are evidences linking reactive oxygen species in the degradation of phospholipids by UV radiation including hydroxyl radical (Okada et al., 1994). This radical can react rapidly with the solvent and produce secondary radicals that can be scavenged by the flavonoids (Yamaguchi et al., 2005).

Additionally, Mandal and Chatterjee (1980) showed that the liposomal membrane leakage is directly related with UV light or sun light exposure. They showed also that an increase of the radiation induced concomitantly an increase of membrane leakage and lipoperoxidation. The results presented in the Table 3 show that among the isolated substances, compound 5 was more effective to protect the membrane toward UV radiation damages (IC_{50} of 21 µM), while the IC_{50} obtained for the majority of the compounds was higher than 50 µM. The IC_{50} for AF was of 25 µg/ml indicating an interaction between the several components of the fraction.

For the assays of microsomal lipoperoxidation induced by the ascorbyl and hydroxyl radicals it is possible to observe that all substances showed similar results when the membrane damage was induced by UV light although reinforcing the high activity of HE and

AF. The protective ability of the catechin **5** against microsomal peroxidation was evaluated over the ascorbyl radical and UV radiation and showed an IC_{50} lower than that obtained for liposomal peroxidation (6 ± 0.25 and $18 \mu M \pm 4$ respectively).

These results confirm the high protective activity of lipid peroxidation even in liver microsomes of rats, a natural membrane model, that have different composition including proteins, metals, intrinsic antioxidants, among others, when compared with liposomes.

Back in the discussion about redox potential and antioxidant activity because these features do not always correlate directly with the scavenger potential of the compounds, one can include the hydrophobicity ($\log P$) of the compounds as another parameter to be analysed. It is known that flavonoids form reversible physicochemical complexes by setting up the polar heads of most phospholipids by chemical bonds and, therefore, may suggest the existence of a relationship between the solubility of flavonoids and interaction with models membrane (Saija et al., 1995). According to Rice-Evans (1996), the flavonoids partition coefficient is one of the items that define the antioxidant activity in the lipophilic phase. The octanol/water partition coefficients ($\log P$) were calculated for the isolated substances by the software ACD / ChemSketch (Freeware) obtaining the follow results: 1.89 ± 0.21 , 1.42 ± 0.22 , 1, 16 ± 0.24 , 3.06 ± 0.2 , 3.43 ± 0.21 , 3.6 ± 0.39 for the substances 1, 2, 3, 4, 5 and 6 respectively. The $\log P$ values are consistent with most results obtained from the lipid peroxidation protection assays, in which catechin 5, showed the highest partition coefficient, and was the most active among the isolated compounds.

With these practical results obtained, we can estimate the potential of this plant material as a new active row material to be applicated in pharmaceutical and/or cosmetic products to the world market, focusing on the differential preservation of forest, and sustainability of the proposed input.

5. Conclusions

From the results we can conclude that i) the plant material which is normaly wasted can be used as a source of potential molecules with high antioxidant activity, particularly the activity over protection toward UV light; iii) a synergic effect between the components of the extract FA was observed; iii) the plant material presents low cytotoxicity which increases its potential medicinal use; iv) two catechins (**5** and **6**) were described for the first time as natural products; v) the potential

medicinal use of a plant endangered due the extensive loggings increase the reasons for preservation.

Acknowledgements

The authors wish to thanks CNPq for financial support and fellowship for Andrea Seccon, CAPES e FAPESC. They wish also thanks to Prof. Carlos Sanquetta (UFPR) for collecting the plant material.

References

- Bird, R.P., Draper, A.H., 1984. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Meth. Enzymol.* 105, 295-305.
- Brand-Williams, W, Cuvelier, M.E., Berset, C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wiss. Technol.* 28, 25-30.
- Campello, J.P., Fonseca, S.F., 1975. Diterpenes from *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 14, 2299-2300.
- Cheng, H.Y., Yang, C.M., Lin, T.C., Shieh, D.E., Lin, C.C., 2006. ent-Epiafzelechin-(4 α - \rightarrow 8)-epiafzelechin extracted from *Cassia javanica* inhibits herpes simplex virus type 2 replication. *J. Med. Microbiol.* 55, 201-206.
- Choi, C.W., Kim, S.C.; Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161-1168.
- Fonseca, F.N., Ferreira, A.J.S., Sartorelli, P., Lopes, N.P., Floh, E.I.S., Handro, W., Kato, M.J., 2000. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 55, 575–580.
- Fonseca, S.F., Nielsen, L.T., Rúveda, E.A., 1979. Lignans of *Araucaria angustifolia* and ^{13}C NMR analysis of some phenyltetralin lignans. *Phytochemistry* 18, 1703-1708.
- Foo, L.Y., Newman, R., Waghorn, G., McNabb, W.C., Ulyatt, M.J., 1996. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* 41, 617-624.
- Francisco, M.L.L.D., Resurreccion, A.V.A., 2009. Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins. *J. Food Comp. Anal.* 22, 16–24.

Halliwell, B., Wasil, M., Grootveld, M., 1987. Biologically significant scavenging of the mieloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS Letters* 213, 15-18.

Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 10), 5-12.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (Eds.). *Free Radical in Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999.

Hodzic, Z., Pasalic, H., Memisevic, A., Srabovic, M., Saletovic, M., Poljakovic, M., 2009. The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. *Eur. J. Sci. Res.* 28, 471-477.

Hope, M.J., Bally, M.B., Mayer, L.D., Janoff, A.S., Cullis, P.R., 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipids vesicles. *Chem. Phys. Lipids* 40, 89-107.

Kondo, K., Uchida, R., Tokutake S., Maitani, T., 2006. Polymeric grape-seed procyanidins, but not monomeric catechins and oligomeric procyanidins, impair degranulation and membrane ruffling in RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 641-649.

Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C.C., Tankeu, R.K., Ngadjui, B.T., Meyer, J.J., Lall, N., Kuate, J.R., 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *J. Ethnopharmacol.* 120, 17-24.

Landis-Piwowar, K.R., Kuhn, D.J., Wan, S.B., Chen, D., Chan, T.H., Dou, Q.P., 2005. Evaluation of proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing potencies of novel (-)-EGCG analogs and their prodrugs. *Int. J. Mol. Med.* 15,735-742.

Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* 71, 214-222.

Lomonosova, E.E., Kirsch, M., Groot, H., 1998. Calcium vs iron-mediated processes in hydrogen peroxide toxicity to L929 cells: effects of glucose. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 493–503.

Ma, C., Nakamura, N., Hattori, M., Kakuda, H., Qiao, J., Yu, H., 2000. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia*. *J. Nat. Prod.* 63, 238–242.

Mandal, T.K., Chatterjee, S.N., 1980. Ultraviolet- and sunlight-induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiat. Res.* 83, 290–302.
Mannino, S., Brenna, O., Buratti, S., Cosio, M.S., 1998. A new method for the evaluation of the ‘antioxidant power’ of wines. *Electroanalysis* 10, 13, 908–912.

Min, K.R., Hwang, B.Y., Lim, H.S., Kang, B.S., Oh, G.J., Lee, J., Kang, S.H., Lee, K.S., Ro, J.S., Kim, Y., 1999. (-)-Epiarfaelechin: cyclooxygenase-1 inhibitor and anti-inflammatory agent from aerial parts of *Celastrus orbiculatus*. *Planta Med.* 65, 460–462.

Nandakumar, V., Singh, T., Katiyar, S.K., 2008. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett.* 269, 378–387.

Ohashi, H., Kawai, S., Sakurai Y., Yasue, M., 1992. Norlignan from the knot resin of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 31, 1371–1373.
Okada, K., Takahashi, Y., Ohnishi, K., Ishikawa, O., Miyachi, Y., 1994. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *J. Dermatol. Sci.* 8, 183–186.

Puntarulo, S., 2005. Iron, oxidative stress and human health. *Mol. Aspects Med.* 26, 299–312.

Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., Sauder, D.N., 2006. Photoaging: Mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 1–19.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.

Röpke, C.D., Kaneko, T. M., Rodrigues, R. M., Silva, V. V., Barros, S., Sawada, T.C.H., Kato M. J., Barros S.B.M., 2002. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int. J. Pharm.* 249, 109-116.

Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their Interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 481-486.

Schenkman, J.B., Cinti, D.L., 1978. Preparation of microsomes with calcium. *Meth. Enzymol.* 52, 83-88.

Singh, A.P.P., Chauhan, S.M.S., 2009. Activity guided isolation of antioxidants from the leaves of *Ricinus communis* L. *Food Chem.* 114, 1069–1072.

Singleton, V.L., Orthofer, R. Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299:152-178.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4267–4274.

Teixeira, A., Morfim, M.P., Cordova, C.A.S., Charão, C.C.T., Lima, V.R., Creczynski-Pasa, T.B., 2003. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbys radicals and by peroxinitrite. *J. Pineal Research* 35, 1-7.

Vivot, E., Munoz, J.D., Cruanes, M.C., Cruanes, M.J.; Tapia, A., Hirschmann, G.S., Martinez, E., Di Sapio, O., Gattuso, M.; Zacchino, S., 2001. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. *J. Ethnopharmacol.* 76, 65–71.

Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Mascio, P.D., 2009. Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. *Phytochemistry* 70, 615-620.

Yamaguchi, L.F., Mascio, P., Kato, M.J., Vassao, D.G., 2002.
Biflavones from leaves of Brazilian coniferae *Araucaria angustifolia*
protects against lipoperoxidation and DNA single-strand breaks. *Free
Rad. Biol. Med.* 33, 563-567.

Yamaguchi, L.F., Vassao, D.G., Kato, M.J., Di Mascio, P., 2005.
Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials
protective agents against DNA damage and lipoperoxidation.
Phytochemistry 66, 2238-2247.

Table 1 – LC data of the hydroalcoholic extract (HE) of *A. angustifolia*.

Retention time (min)	Wavelength (nm)	Derivative
8.44	259, 293	Unknown
12.52	252	Unknown
14.47	277	Flavanol
17.72	274	Flavanol
23.43	262, 325	Flavonol
23.89	265, 343	Flavonol
24.03	266, 343	Flavonol
25.99	278	Flavanol
33.63	274	Flavanol
35.33	369	Unknown
36.32	272	Flavanol
39.49	272	Flavanol

Table 2. Reactivity with DPPH and redox potential of *A. angustifolia* dead-bark extract, fraction and isolated compounds.

Compounds	DPPH reactivity		Cyclic voltammetry	
	$\mu\text{g/ml}$	μM	Oxidation potencial	Reduction potencial
HE	1 ± 0.10	-	286	186
FA	0.9	-	286	189
1	-	> 50	391	-
2	-	10 ± 3	358	436
3	-	$1 \pm$	523	69
4*		$0.6 \pm$	229	196
5	-	$0.7 \pm$	284	182
6	-	11 ± 3	339	-

*Quercetin was used as control. The calculations were made in the statistic software Graphpad Prisma V.4.0 using the mean \pm standard deviation and $n = 3$

Table 3. Prevention of lipid peroxidation induced by UV light of *A. angustifolia* dead-bark extract, fraction and isolated compounds.

Compounds	Liposomal lipid peroxidation					
	UV radiation		Ascorbyl		Hydroxyl	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
HE	36 ± 3	-	18 ± 1	-	12 ±	-
FA	25 ±	-	17 ± 1	-	22 ± 2	-
1	-	> 50	-	> 50	-	> 50
2	-	> 50	-	> 50	-	> 50
3	-	> 50	-	> 50	-	> 50
4		9 ±	-	30 ±	-	> 50
5	-	21 ±	-	35 ±	-	> 50
6	-	> 50	-	> 50	-	> 50

The calculations were made in the statistic software Graphpad Prisma V.4.0 using the mean ± standard deviation and n = 3.

Figure Captions

Figure 1: Compounds 1-7, isolated from the *A. angustifolia* dead-bark.

Figure 2: Chromatogram of the hydroalcoholic extract (HE) of *A. angustifolia*. Detection: 280 nm. Peaks 1 and 2: unknown phenolics, peak 3: polymeric phenolics. Frame A: UV profile of compounds 1 and 2.

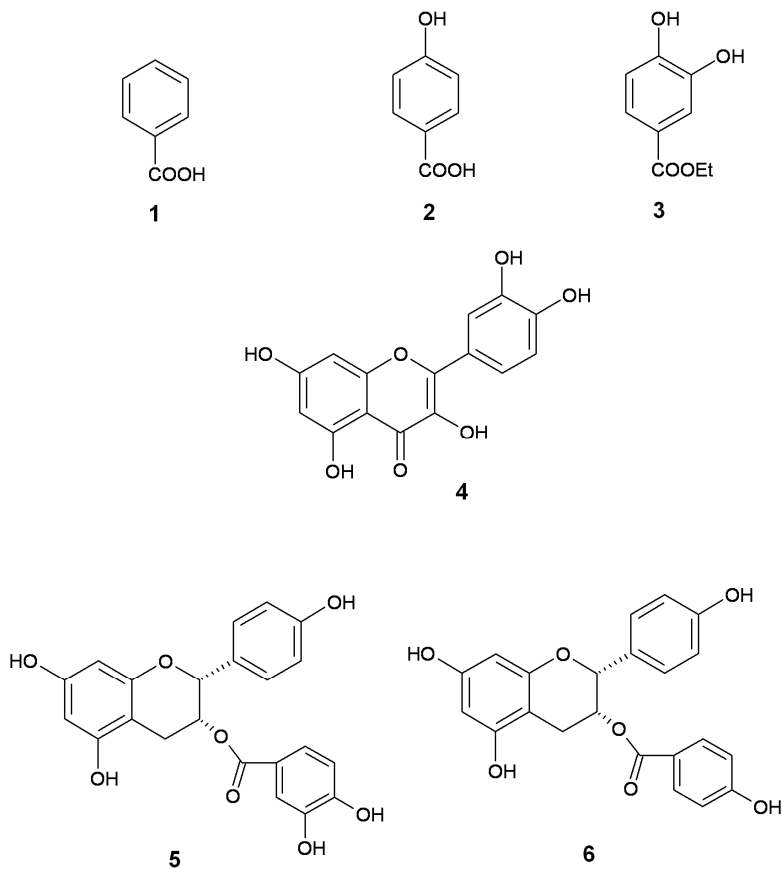


Figure 1

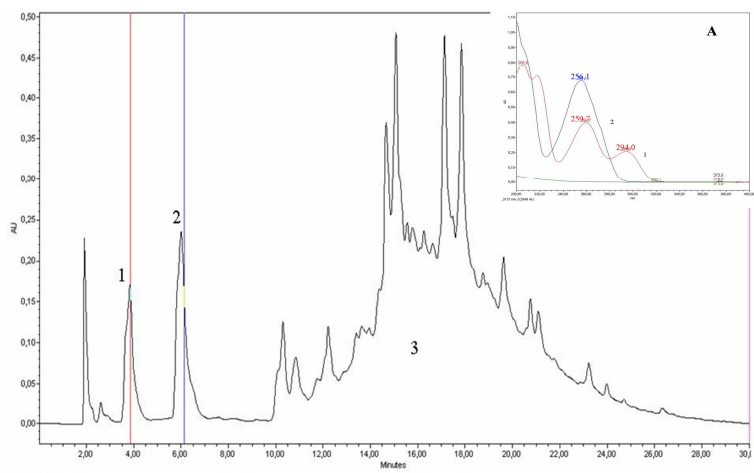


Figure 2